

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E. A. P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Actividad antioxidante y antimicrobiana de los
compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de la
corteza de *Triplaris americana* L. (*Tangarana
colorada*)**

TESIS

para optar al título profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Miguel Ángel Inocente Camones

ASESORA

Bertha Jurado Teixeira

Lima-Perú

2009

DEDICATORIA

Con alma y corazón dedico mi tesis a Dios quien en momentos difíciles dió luz a mi camino y sabiduría para elegir la senda del triunfo.

Con mucho agradecimiento y fervor al Señor de los Milagros, Virgen de las Mercedes, Santa Rosa de Lima y todos los santos.

Con mucha gratitud, afecto, respeto y meritorio valor a mi madre Hermelinda Maximina Camones Salvador, por lograr un hijo profesional haciendo lo posible de lo imposible, y muchas gracias por ayudarme en momentos difíciles en el camino de mi vida.

Elevo una oración a la memoria de mi amiga Raquel Titto Cusipaucar quien me guió desde el cielo a darme fe y esperanza para seguir en el andar de mi vida.

Elevo una oración a la memoria de mi abuelito Manuel Camones, mi tía Margarita Camones, mi primo Jonatan Camones, la señora Amanda Linares, la señora Elva Espinoza, quienes desde el cielo me dieron fuerzas para seguir luchando por lograr mis sueños.

**Con mucho cariño y amor a Iris Mondragón, por su comprensión,
apoyo incondicional, sincero en el transcurso de toda mi tesis.
Dios le bendiga y otorgue luz en su camino de triunfos.**

**A Evelyn Taype, por su ayuda científica y comprensión en
etapas muy importantes de mi tesis.
Dios le otorgue buena salud y camino del triunfo para su vida.**

**A mis asesores de tesis Q.F. Bertha Jurado y Q.F. Teresa Gallardo
y Mg. Arilmí Gorriti por su valiosa ayuda incondicional,
demostrando ser modelos éticos, morales y sociales para seguir.
Dios las bendiga y otorgue mucha felicidad en su vida.**

**A la Dra. Augusta Córdova, Mg. Moisés García, Dr. Pablo Bonilla,
Mg. Américo Castro, Q.F. María Calixto, Q.F. Gloria Gordillo,
Q.F. Andrés Revilla, Q.F. Julio Ruíz, Q.F. Carlos Herrera,
Biol. José Campos, Ing. Violeta León, Bach. Alix Romero, Bach. Janet
Aime, Sr. Ilario Santiago y a todas las personas quienes otorgaron
su apoyo y asesoría en etapas muy importantes de mi tesis.
MUCHAS GRACIAS**

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

**A los distinguidos miembros del jurado por sus sugerencias
y aportes al trabajo de investigación realizado.**

Dra. Nancy Lozano Reyes

Q.F. Jesús Lizano Gutiérrez

Mg. Raúl Soria López

Q.F. María Elena Salazar Salvatierra

SUMARIO

	Página
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
ABREVIATURAS	5
I. INTRODUCCIÓN	6
II. GENERALIDADES	8
2.1. <i>Triplaris americana</i> L. (Tangarana colorada).	9
2.1.1. Hábitat y propiedades medicinales.	
2.1.2. Descripción botánica.	
2.1.2.1. Características de la familia y el género.	
2.1.2.2. Clasificación taxonómica y descripción de la especie.	
2.1.3. Estudios realizados de la especie.	
2.2. Metabolitos primarios y secundarios.	16
2.2.1. Compuestos fenólicos.	
2.2.2. Taninos.	
2.3. Antioxidantes.	26
2.3.1. Radicales libres.	
2.3.2. Antioxidantes naturales.	
2.4. Antimicrobianos naturales.	31
III. SECCIÓN EXPERIMENTAL	32
3.1. Materiales, equipos y reactivos.	32
3.1.1. Estudio farmacognóstico.	
3.1.2. Análisis toxicológico.	
3.1.3. Actividad antioxidante.	
3.1.4. Actividad antimicrobiana.	
3.2. Metodología	37
3.2.1. Recolección y selección de la droga.	
3.2.2. Análisis histoquímico.	
3.2.3. Estabilización de la droga.	
3.2.4. Obtención y tratamiento del extracto.	
3.2.5. Estudio farmacognóstico.	38
3.2.5.1. Ensayos preliminares.	
3.2.5.2. Screening farmacognóstico.	

3.2.5.3.	Análisis cromatográfico.	
3.2.5.4.	Caracterización y conversión de proantocianidinas en antocianidinas.	
3.2.5.5.	Análisis UV-Visible e Infrarrojo.	
3.2.5.6.	Cuantificación de compuestos fenólicos.	
3.2.5.7.	Cuantificación de taninos condensados.	
3.2.6.	Evaluación de la toxicidad aguda a dosis límite.	51
3.2.7.	Evaluación de la actividad antioxidante.	53
3.2.8.	Evaluación de la actividad antimicrobiana.	57
IV.	RESULTADOS	61
4.1.	Del análisis histoquímico.	61
4.2.	Del estudio farmacognóstico.	62
4.2.1.	Del análisis preliminar.	
4.2.2.	Del screening farmacognóstico.	
4.2.3.	Del análisis cromatográfico.	
4.2.4.	Del análisis de proantocianidinas.	
4.2.5.	Del análisis UV-visible e Infrarrojo.	
4.2.6.	De la cuantificación de compuestos fenólicos.	
4.3.	De la toxicidad aguda a dosis límite.	79
4.4.	De la actividad antioxidante.	80
4.5.	De la actividad antimicrobiana.	84
V.	DISCUSIÓN	87
VI.	CONCLUSIONES	92
VII.	RECOMENDACIONES	93
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
IX.	ANEXOS	110
9.1.	ANEXO Nº 1	
9.2.	ANEXO Nº 2	
9.3.	ANEXO Nº 3	
9.4.	ANEXO Nº 4	
9.5.	ANEXO Nº 5	
9.6.	ANEXO Nº 6 A y B	
9.7.	ANEXO Nº 7	
9.8.	ANEXO Nº 8 A y B	
9.9.	ANEXO Nº 9 A y B	

ABREVIATURAS

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico.
APW:	Vía alternativa del sistema de complemento humano.
Banda B:	Banda bencenoide de compuestos aromáticos.
Banda E:	Banda etilénica de compuestos aromáticos.
Banda K:	Banda de conjugación de compuestos aromáticos.
Banda R:	Banda radicalaria de compuestos aromáticos.
CMI:	Concentración Mínima Inhibitoria.
CPW:	Vía clásica del sistema de complemento humano.
c.v.f:	Coeficiente de variación del factor.
DPPH:	Radical libre 2,2 difenil-picrilhidrazilo.
DS:	Desviación estándar.
HCl:	Ácido clorhídrico.
IC₅₀:	Concentración que inhibe el 50% de casos.
N:	Normalidad.
IR:	Infrarrojo.
R:	Coeficiente de correlación.
RMN:	Resonancia Magnética Nuclear.
UV:	Ultravioleta.
USAQ:	Unidad de Servicios de Análisis Químicos.

RESUMEN

En el análisis farmacognóstico del extracto hidroalcohólico de la corteza de *Triplaris americana* L., se han evidenciado compuestos fenólicos: taninos (*taninos condensados*) y flavonoides. En el extracto hidroalcohólico y aislado amílico del hidrolizado del extracto hidroalcohólico desecado, se observaron picos de absorción, en longitudes de onda para los grupos hidroxilos y grupo aromático, mediante espectrofotometría Infrarrojo (IR-FT) y espectrofotometría UV-visible. Se desarrolló y validó la cuantificación de taninos del extracto hidroalcohólico, mediante espectrofotometría Ultravioleta-visible, donde el método resultó ser selectivo, lineal, preciso (repetible y reproducible) y exacto; y se obtuvieron como resultado para compuestos fenólicos totales: 13.5158 ± 0.1825 g de ácido tánico/ 100 g de corteza, para taninos: 11.8590 ± 0.5453 g de ácido tánico/ 100 g de corteza; y para taninos condensados: 1.62368 ± 0.0784 g de ácido tánico/ 100 g de corteza. Al evaluar la toxicidad a dosis única del extracto hidroalcohólico (2000 mg/ kg de masa corporal), no se produjo mortalidad ni se manifestaron síntomas indicativos de toxicidad en los animales. Se evaluó la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico, aplicando el método del DPPH obteniendo como concentración inhibitoria IC_{50} 19.53 μ g/mL, con resultado levemente superior comparado con el estándar Trolox; y 0.241 mg/mL equivalentes Trolox. En el ensayo de la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico en concentraciones de 3 mg/ disco, 4 mg/ disco y 6 mg/ disco, se obtuvo una respuesta antibacteriana selectiva sobre las bacterias Gram positivas evaluadas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*; y ausencia de actividad sobre las bacterias Gram negativas y actividad antifúngica.

Palabras claves: *Triplaris americana* L., taninos condensados, antioxidante, antimicrobiana, IR, UV-visible, cuantificación.

ABSTRACT

In the pharmacognostic analysis of the hidroalcoholic extract of the bark of *Triplaris americana* L., has been evidenced phenolics compound: tannins and flavonoids. In the hidroalcoholic extract and amilic isolated of the hydrolyzed of the extract dried up hidroalcoholic, picks of absorption were observed, in wave longitudes for the groups oxidriles (-OH) and aromatic group, by means of Infrared infrared spectrophotometry and UV-visible spectrophotometry. It was developed and it validated the quantification of tannins of the hidroalcoholic extract, by means of Ultraviolet-visible spectrophotometry, where the method turned out to be selective, lineal, precise (repeat and reproduce) and exact; and they were obtained as a result for compound total phenolic: 13.5158 ± 0.1825 g of tannic acid/ 100 g of bark, for tannins: 11.8590 ± 0.5453 g of tannic acid/ 100 g of bark and for condensed tannins: 1.62368 ± 0.0784 g of tannic acid/ 100 g of bark. When evaluating the toxicity to unique dose of the hidroalcoholic extract (2000 mg/kg of corporal mass), mortality didn't take place neither they showed indicative symptoms of toxicity in the animals. The antioxidant activity of the extract hidroalcoholic was evaluated, applying the method of the DPPH obtaining as inhibitory concentration IC_{50} 19.53 g/mL, with slightly superior result compared with the standard Trolox; and 0.241 mg/mL equivalent Trolox. In the rehearsal of the antimicrobial activity from hidroalcoholic extract in concentrations of 3 mg/ disc, 4 mg/ disc and 6 mg/ disc, a selective antibacterial answer was obtained on the bacterial evaluated Gram positive: *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*; and activity absence on the bacterial Gram negative and activity anti-yeast.

Key words: *Triplaris americana* L., condensed tannins, antioxidant, antimicrobial, IR, UV-visible, quantification.

I. INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los más numerosos y representativos grupos de metabolitos secundarios de las plantas y su relevancia radica en su participación en la fisiología y el metabolismo celular como morfología, crecimiento, reproducción, defensa contra plagas y predadores, y procesos germinativos, entre otros. Estos compuestos están presentes en la mayoría de los productos naturales consumidos por el hombre y en estudios recientes se ha demostrado una significativa actividad antioxidante, que evidencia su potencial beneficio sobre la salud humana.¹ Los antioxidantes derivados de plantas generalmente son flavonoides o compuestos fenólicos presentes en diferentes extractos vegetales.²

Los compuestos extraídos de las plantas que poseen actividad antimicrobiana generalmente son compuestos fenólicos y polifenoles entre los que se encuentran: quinonas, flavonoides, taninos y cumarinas. Otros son los terpenoides y aceites esenciales, alcaloides, lecitinas y polipéptidos, entre otros.³

***Triplaris americana* L.** conocida vulgarmente como **tangarana colorada**; es un árbol mirmecófilo de casi 16 metros de altura; y su corteza se utiliza en el tratamiento de malaria para la Atención Primaria de Salud (APS) en la selva peruana. Asimismo, se utiliza la decocción, infusión o macerado alcohólico de su corteza, por vía oral para curar infecciones intestinales, fiebre, diarrea, dolor de muelas; que podría indicar presencia de compuestos fenólicos con actividad antibacteriana y antioxidante, entre otras.^{4, 5}

Para su extracción, la utilización de alcohol etílico tiene la ventaja de preservar mejor los extractos e inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y otros, además de desnaturalizar las enzimas que pueden degradar los compuestos biológicamente activos; dado su uso etnofarmacológico, se eligió utilizar para el estudio, el extracto hidroalcohólico de la corteza.

No existen trabajos de referencia sobre la actividad antimicrobiana y antioxidante de la especie ***Triplaris americana* L. (Tangarana colorada)**, por lo que este estudio aporta los primeros antecedentes de estas actividades y su posible utilización como excipiente en industria alimentaria, cosmética o producto natural; asimismo, los resultados permitirán continuar con los estudios tendientes a purificar la muestra e intentar aislar el o los principio/s activo/s.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivos:

- Realizar el análisis farmacognóstico del extracto hidroalcohólico de la corteza de Tangarana colorada.
- Determinar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de la corteza de Tangarana colorada.
- Determinar la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de la corteza de Tangarana colorada.
- Evaluar la toxicidad a dosis límite del extracto hidroalcohólico de la corteza de Tangarana colorada en ratas albinas.

Esta investigación se ha realizado gracias al apoyo de la Cátedra de Farmacognosia y Medicina Tradicional, el Centro Latinoamericano de Enseñanza e Investigación de Bacteriología Alimentaria y la Cátedra de Bioquímica.

II. GENERALIDADES

2.1. *Triplaris americana* L. (Tangarana colorada)

2.1.1. Habitat y propiedades medicinales

***Triplaris americana* L.** es una especie endémica de América, crece a los 350 msnm, en el departamento de San Martín, Amazonas, Lima, Pasco, Junín, Huánuco, Loreto y Madre de Dios y en países como Panamá, Guyana, Guyana Francesa, Surinam, Venezuela, Brasil, Bolivia, Colombia y Ecuador.⁶

En Bolivia, la decocción de la corteza es utilizada por mujeres parturientas, en caso de metrorragias; contra la diarrea, dolor de estómago y lombrices intestinales. El polvo de la corteza se aplica también como cataplasma para las lesiones de la piel inducidas por leishmaniasis.^{7, 8}

En la medicina tradicional peruana se utiliza la decocción o infusión de su corteza por vía oral para curar infecciones intestinales, fiebre, diarrea, dolor de muelas. El PRODAPP para la Atención Primaria de la Salud (APS) recomienda el uso de ésta planta para el tratamiento de la malaria, en la región Huánuco.^{4, 5, 9}

2.1.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

2.1.2.1. Características de la familia y el género

La familia **Polygonaceae**, única representante del orden *Polygonales*, comprende cerca de 30 géneros y 1000 especies ampliamente distribuido en regiones templadas y sub-tropicales.¹⁰

En el Perú, la familia Polygonaceae está representada por 5 géneros y 44 especies.

Muehlenbeckia	[7 especies]
Symmeria Benth.	[1 especie]
Coccoloba P. Browne	[20 especies]
Triplaris Loefl. ex L.	[13 especies]
Ruprechtia C. A. Mey.	[3 especies]

La familia incluye, **hierbas, arbustos o árboles**, a veces escandentes, a veces con zarcillos, a veces caducifolios, a veces con tricomas glandulares; tallos frecuentemente dilatados en los nudos, a veces geniculados, a veces fistulosos. **Hojas**: simples, alternas (opuestas o verticiladas), enteras u onduladas, pinnatinervias, pecíolos \pm vaginados, usualmente con estípulas unidas en una vaina –*ócrea*–, frecuentemente escariosas. **Inflorescencias** de posición axilar, laterales o terminales, en panículas, racimos o espigas (cimas, fascículos o flores solitarias), bracteadas, pedicelos articulados. **Flores** bisexuales (unisexuales en plantas monoicas o dioicas), frecuentemente rodeadas por brácteas ocráceas –*ocréolas*– y escariosas, actinomorfas, hipóginas (períginas); perianto en 1–2 verticilos, tépalos de 3–6, libres o unidos en la base, imbricados; estambres de 3–9, usualmente en 1–2 verticilos, filamentos libres o unidos en la base, anteras 2–tecadas, versátiles, introrsas, dehiscencia longitudinal (loculicida); disco anular o en glándulas alternas con los estambres; pistilo 1, súpero, aplanado o triquetro, 1-locular, óvulos 1 por lóculo, estilos 3, estigmas filiformes o capitados, enteros o fimbriados. **Fruto**: aquenio aplanado o triquetro, generalmente con pericarpo crustáceo, a veces en pseudodrupa con el perianto succulento acrescente.^{6, 11}

La familia Polygonaceae, posee compuestos de naturaleza glucosídica pero carecen de alcaloides y saponinas, y son raras las esencias. A menudo contienen ácidos orgánicos; principalmente ácido oxálico en forma de sales, con menor frecuencia presenta ácido málico y ácido cítrico; asimismo poseen taninos, hallados en la mayoría de especies de la familia.^{6, 12-15}

El género ***Triplaris*** Loefl. ex L. incluye árboles dioicos; (es decir son plantas femeninas y otras masculinas) ramas con médula fistulosa, septada. **Hojas:** ligeramente inequiláteras, generalmente con 3-6 estrías longitudinales conspicuas formadas por los pliegues en yema; ócreas deciduas. **Inflorescencias:** terminales, espiciformes, en panículas o racimos de flores solitarias o fasciculadas, ocreoladas; flores son unisexuales, subsésiles. **Flores:** estaminadas o masculinas con 6 tépalos subiguales, estambres de 3 a 9, excediendo los tépalos, filamentos ligeramente unidos a los tépalos pero sin formar anillo, pistiloide ausente; las flores pistiladas o femeninas con tépalos de 6 en 2 verticilos fuertemente disímiles, los 3 extremos unidos en la base formando un tubo y con la porción distal desarrollado en una ala oblanceolada, los 3 internos pequeños, libres o parcialmente unidos; estaminodios ausentes u ocasionalmente en un disco anular; pistilo triquetra, 3 estilos, estigmas verruculosos. **Fruto:** aquenio apiculado y envuelto por el perianto persistente y alado.

El género ***Triplaris*** comprende 13 especies en el Perú, distribuida mayormente en selva baja y algunas especies en selva alta.

Triplaris peruviana Fischer y Meyer (Tangarana sin madre, tangarana, tangarana blanca), es usada para tratar diarreas (los nativos de la selva, en casos de diarrea hacen cocinar cerca de 200 gramos de corteza en un litro de agua, dejan que el líquido se

reduzca a la mitad o un cuarto de litro, una vez reposado lo toman como si fuera un té); para picadura de raya (aplican emplastos de la corteza fresca y molida sobre hinchazones de los pies y piel infectada por picaduras de mosquitos); para fiebre interior (toman el cocimiento de la corteza); para abscesos/forúnculos (emplasto con la corteza).

6, 12

Triplaris poeppigiana Weddell (Tangarana del bajo, tangarana), es utilizado para tratar diarrea, enteritis, fiebre; para tratar reumatismo utilizan las picaduras de hormigas que viven en los árboles.¹²

Triplaris surinamensis Cham. (Barrabás, hormigo, maicharo-ey, palo maría, palo santo, tangarana, volador, tankána), es utilizado para tratar dolor de muelas (jugo de la corteza aplicado al diente), hemorroides.¹²

2.1.2.2. Clasificación taxonómica y descripción de la especie

De acuerdo al Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist et al. (1981), ocupa las siguientes categorías taxonómicas:

REINO	: PLANTAE
DIVISIÓN	: MAGNOLIOPHYTA
CLASE	: MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	: CARYOPHYLLIDAE
ORDEN	: POLIGONALES
FAMILIA	: POLYGONACEAE
GÉNERO	: <i>Triplaris</i> Loefl. Ex L.
ESPECIE	: <i>Triplaris americana</i> L.

Nombre vulgar: Tangarana colorada, tangarana, santo palo, cumbi, palo de hormiga, árbol de hormiga.

Las características para su reconocimiento en el campo, son las abundantes inflorescencias con flores rojas; y como hospederos de hormigas en ramas de la corteza, las cuales son llamadas tangarana, que atacan a las personas que se apoyen en el árbol (Foto N° 3 y N° 5). Se cuenta que en la antigüedad se amarraban a los infieles a su tronco, como castigo; por el mismo motivo, los nativos le dieron el nombre de palo santo porque nadie lo toca.^{4, 5, 8}

***Triplaris americana* L.** es una especie arbórea de 10 a 30 m de altura, 40 cm de diámetro, con flores verde rojizas (Foto N° 1). Sus troncos y sus ramas son mimercófilas cuya **corteza** es gris moteado, liso; ramas de color marrón claro a marrón, estriados, glabros (Foto N° 2 y N° 3). Presenta **hojas** simples, enteras, estrechamente ovado-oblongos a lanceoladas, ápice longi-acuminado, base atenuada a obtuso-o cuneado-decurrente, glabras; venas secundarias de 15 – 20 pares; peciolos aplanados, 10-15 mm de largo, caducas (Foto N° 4). Las **inflorescencias** estaminadas, marrón pubescente; perianto disperso-pubescente, lóbulos subliguales. Las plantas son dioicas, debido a que las flores masculinas están en una planta y las flores femeninas en otra planta (Foto N° 5). Los **frutos** son aquenios de 9 mm de largo, el perianto del fruto de 3-3.5 cm de largo, tépalos externos rojos, los internos rojo-amarillentos abruptamente apendiculados de 5-7 mm de largo.¹⁵



Foto N° 1. Árbol de *Triplaris americana* L.



Foto N° 2. Corteza de *Triplaris americana* L.

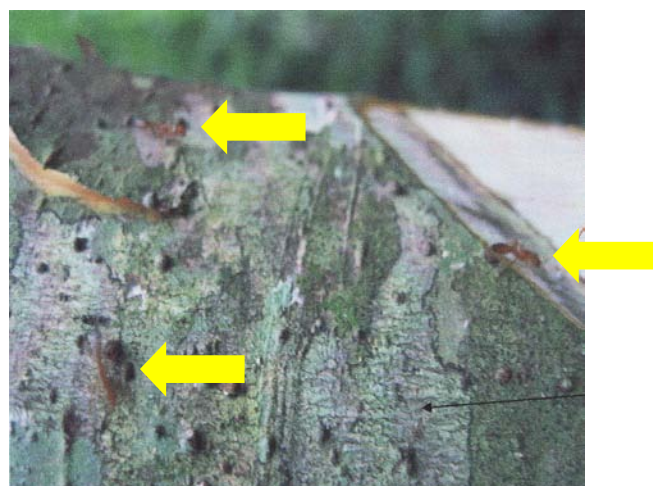


Foto N° 3. Presencia de hormigas tangarana en la corteza.



Foto Nº 4. Rama y hoja de *Triplaris americana* L

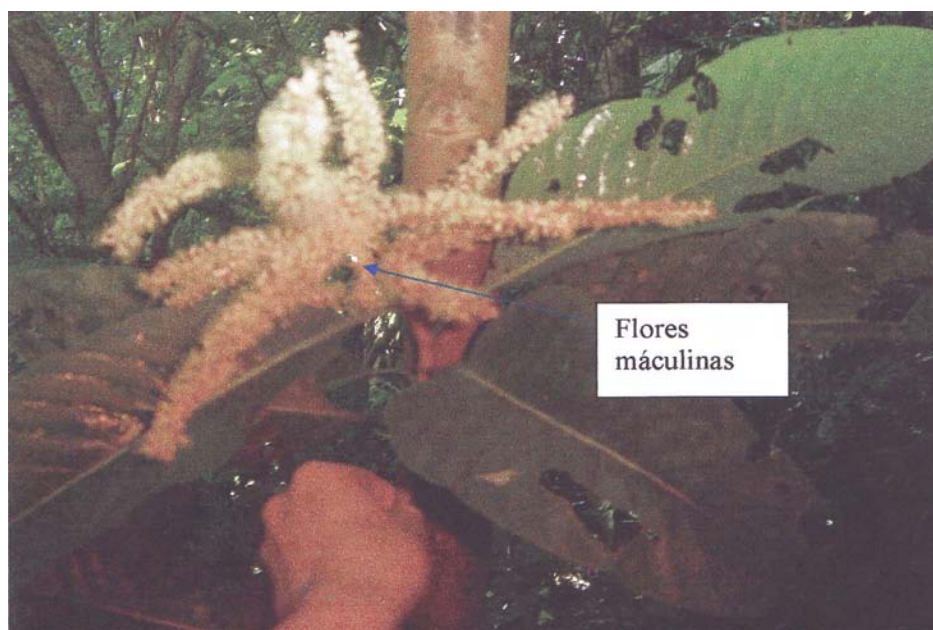


Foto Nº 5. Inflorescencia con flores masculinas de tangarana colorada.

2.1.3. ESTUDIOS REALIZADOS CON *Triplaris americana* L.

Estudios preliminares destacan que la **Tangarana colorada** presenta actividad antimalárica contra una cepa de *Plasmodium falciparum* resistente a la cloroquina así como actividad *in vivo* en roedores infectados con *Plasmodium vinckei petteri* 279 BY.^{4, 5, 16}

El extracto de la corteza de *Triplaris americana* muestra buena actividad antimalárica *in vivo* (93 % de inhibición a 350 mg/kg) e *in vitro* (83 % de inhibición a 100 ug/mL).⁴

Deharo, et al. han encontrado actividad inmunomoduladora *in vitro* en la corteza de *Triplaris americana* L. El extracto etanólico de la corteza de *Triplaris americana* L. mostró una alta actividad inhibitoria ($IC_{50} = 89 \mu\text{g/mL}$) en el APW (vía alternativa del sistema del complemento humano) y $IC_{50} = 74 \mu\text{g/mL}$ en el CPW (vía clásica del sistema de complemento humano).⁷ El extracto metanólico mostró actividad antioxidante medida por la reducción de la fosforescencia química del luminol.^{7, 17}

En el género *Triplaris* han sido aislados cinco glicósidos flavonoles: quercetina 3-O-b-D-(400,600-digaloil)-glucopiranosido, camferol 3-O-a-L-(500-galoil)-arabinofuranósido, quercetina 4-O-a-L-arabinofuranósido, quercetina 3-O-a-L-(500-galoil)-arabinofuranósido, y quercetina 3-O-b-D-(600-galoil)-glucopiranosido en el extracto de acetato de etilo de hojas frescas de *Triplaris cumingiana*.^{18, 19}

De las partes aéreas, tallos y frutas frescas de *Triplaris americana* L. (trabajo de investigación realizado en Brasil), se aislaron triterpenos: **friedelin y friedelinol**, glicósido fenilpropanoide: **vanicósido D**, amida: **moupinamida**, compuesto fenólico: **ácido gálico**, glicósido flavónico: **quercetina 3-O- α -L-arabinofuranósido**, aglicona de flavonol: **quercetina** (Gráfico N° 1).¹⁸

2.2. METABOLITOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS

Los productos iniciales de la fotosíntesis en organismos autótrofos fotosintéticos son los carbohidratos, que mediante reacciones metabólicas conducen a la formación de los metabolitos primarios, cuya característica principal es su distribución universal, que a su vez sirven como material de partida de los compuestos conocidos como metabolitos secundarios cuyas estructuras relativamente complejas y distribución restringida a ciertas fuentes botánicas, presentan relaciones específicas con el entorno que les rodea;²⁰ de esta manera, los metabolitos secundarios de la planta, permiten relacionarla en fenómenos como polinización, competencia y principalmente defensa con otros organismos así como sequías y estrés de su entorno.²¹

Fuente: Oliveira, P.; Conserva, L.; Lemos, R. Chemical constituents from *Triplaris americana* L. (Polygonaceae). Biochemical Systematics and Ecology. Maceió. 2008.¹⁸

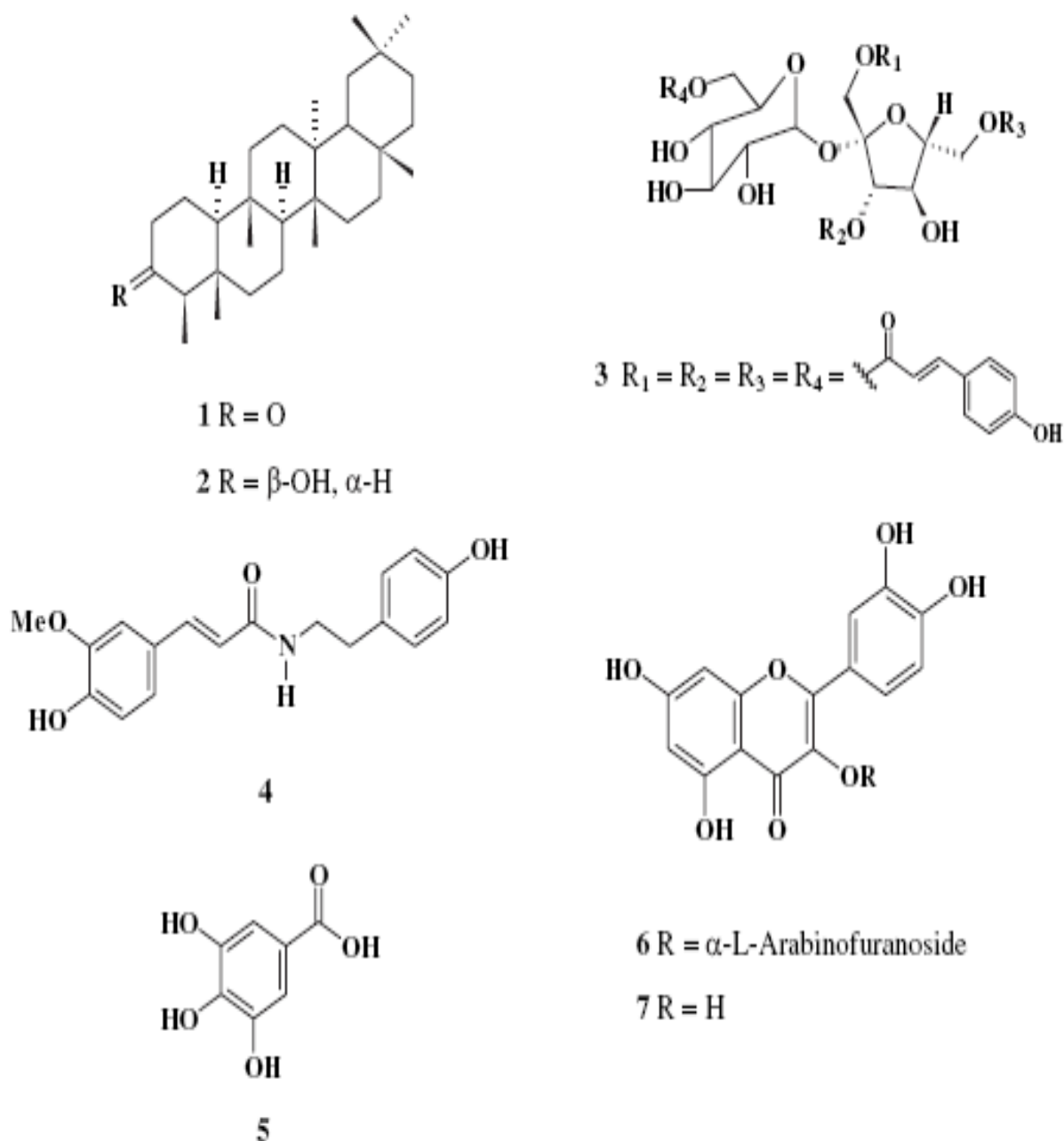


Gráfico N° 1. Compuestos encontrados en *Triplaris americana* L. (Brasil):

1. Friedelin 2. Friedelinol 3. Vanicósido D 4. Moupinamida 5. Ácido gálico 6. Quercetina 3-O- α -L-arabinofuranósido 7. Quercetina

2.2.1. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son un conjunto heterogéneo de moléculas, que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas (Gráfico N° 2); se encuentran en muchas plantas, algunas de uso común por sus propiedades antioxidantes merecen mayor atención. Este grupo de compuestos posee propiedades: antioxidantes, antiinflamatorias, antiagregantes plaquetarios, antimicrobianas, antirradicales libres, antimutagénicas, anticarcinogénicas, antiaterogénicas y quimioprotectoras. ²²⁻²⁹

Fuente: Leighton, F.; Urquiaga, I. Polifenoles del vino y salud humana. Antioxidantes y calidad de vida. 2000.

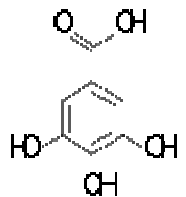
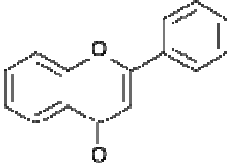

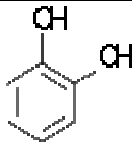
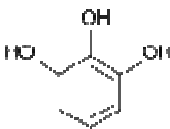
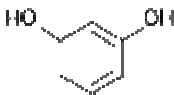
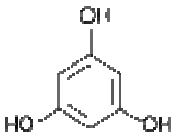

Unidad base:	 Ácido gálico	 Flavona	 Ácido cinámico
Clase/Polímero:	Taninos hidrolizables	Flavonoide, Taninos condensados	Ligninas

Gráfico N° 2. Grupos característicos de compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos se clasifican de acuerdo al tipo y número de subcomponentes fenólicos presentes (Tabla N° 1) ³⁰

Tabla N° 1. Clasificación de compuestos fenólicos, de acuerdo al tipo y número de subcomponentes fenólicos presentes.

ESTRUCTURA	COMPUESTO	EJEMPLOS
	Fenol	Ligninas derivadas de ácido cumárico, kaempferol.
	Pirocatecol	Catequiza, quercetina y ligninas derivadas de ácido ferúlico, ésteres de hidroxitirosol.
	Pirogalol	Galocatequinas, taninos, miricetina, ligninas derivadas de alcohol sinapil.
	Resorcinol	Resveratrol
	Floroglucinol	Casi todos los flavonoides
	Hidroquinona	Arbutina

Fuente: Leighton, F.; Urquiaga, I. Polifenoles del vino y salud humana. Antioxidantes y calidad de vida. 2000.

Los compuestos fenólicos son también clasificados de acuerdo con el número de átomos de carbono del esqueleto base. En la Tabla N° 2 se presentan los principales polifenoles identificados en nuestra dieta.³⁰

Tabla N° 2. Clasificación de compuestos fenólicos, de acuerdo al número de átomos de carbono del esqueleto base.

Átomos de carbono	Esqueleto	Tipo
6	C ₆	Fenoles Simples
		Benzoquinonas
7	C ₆ - C ₁	Ácidos Fenólicos
8	C ₆ - C ₂	Derivados de Tirosina
		Ácidos Fenilacéticos
9	C ₆ - C ₃	Ácidos cinámicos
		Fenilpropenos
		Cumarinas
10	C ₆ -C ₄	Naftoquinonas
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas
14	C ₆ - C ₂ -C ₆	Estilbenos
		Antraquinonas
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides
		Isoflavonoides
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanos
		Neolignanos
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Bioflavonoides
n9	(C ₆ -C ₃) _n	Ligninas
n6	(C ₆) _n	Melaninas catecólicas
n15	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Taninos condensados

Fuente: Leighton, F.; Urquiaga, I. Polifenoles del vino y salud humana. Antioxidantes y calidad de vida. 2000.

2.2.2. TANINOS

Los taninos hallados en este amplio grupo de compuestos fenólicos son metabolitos secundarios, presentan estructura química variada no nitrogenados, solubles en agua, mezclas hidroalcohólicas, acetona (Gráfico N° 3) y tienen en común su carácter astringente (precipitan las proteínas) y su capacidad de curtir la piel. ³¹⁻³⁴

Se encuentran repartidos en el mundo vegetal, especialmente en algunas familias (Fagáceas, Rosáceas, Fabáceas, Mirtáceas, etc.) y en diversos órganos: raíces-rizomas, cortezas, leño, hojas, frutos, etc. ³⁵

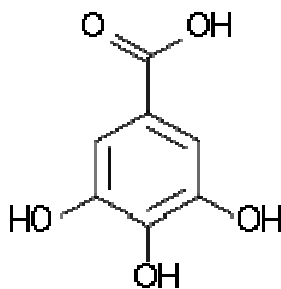


Gráfico N° 3. Estructura química base de los taninos.

❖ Clasificación

La fórmula $C_{14}H_{14}O_{11}$, considerada en algunas bibliografías como tanino común, es sólo aproximada, ya que son polímeros complejos. Existen dos categorías de taninos, clasificados en base a su vía de biosíntesis y sus propiedades químicas: los taninos condensados y los taninos hidrolizables. ³¹⁻³⁶

- ✓ Los **taninos condensados (proantocianidinas)**: polímeros de varios núcleos flavan-3-ol. Se hidrolizan por hidrólisis enzimática y son resistentes a la hidrólisis ácida obteniendo como productos: antocianidinas y flobáfenos. Se encuentran preferentemente en plantas leñosas. ^{31-34, 36}

- ✓ Los **taninos hidrolizables**: polímeros heterogéneos formados por ácidos fenólicos, en particular ácido gálico y azúcares simples. Son más pequeños que los taninos condensados, porque la mayoría tiene una masa molecular entre 600 y 3000. Se hidrolizan tanto por hidrólisis ácida o básica como por hidrólisis enzimática.³¹⁻³⁵

❖ **Propiedades funcionales en la planta**

En las plantas, los taninos cumplen funciones de defensa ante el herbivorismo. Los taninos son considerados toxinas que reducen significativamente el crecimiento y la supervivencia de muchos herbívoros cuando se adicionan a su dieta. Además, tienen potencial de producir rechazo al alimento ("antifeedants" o "feeding repellents") en una gran diversidad de animales. Los mamíferos como la vaca, el ciervo y el simio característicamente evitan a las plantas o partes de las plantas con alto contenido de taninos.^{37, 40}

Si bien existen taninos específicos que pueden ser saludables para el hombre, en general son tóxicos, debido a las mismas propiedades que los hace buenos para la curtiembre: su capacidad de unirse con las proteínas de forma no específica. Durante mucho tiempo se pensó que los taninos formaban complejos con las proteínas del intestino de los herbívoros formando puentes de hidrógeno entre sus grupos hidroxilo y los sitios electronegativos de la proteína, pero evidencias más recientes también avalan una unión covalente entre los taninos (y otros compuestos fenólicos provenientes de las plantas) y las proteínas de los herbívoros que los consumen. El follaje de muchas plantas contiene enzimas que oxidan los fenoles a sus formas quinona en los intestinos de los herbívoros.³⁸ Las quinonas son altamente reactivas, electrofílicas, y reaccionan con los grupos de proteínas nucleofílicos -NH₂ y -SH. Cualquiera sea el mecanismo por el que ocurra la unión proteína-tanino, este proceso tiene un impacto negativo en la nutrición de los herbívoros.

Los taninos pueden inactivar las enzimas digestivas de los herbívoros y crear complejos agregados de taninos y proteínas de plantas que son difíciles de digerir.^{37, 40}

Los herbívoros que habitualmente se alimentan de material rico en taninos parecen poseer algunas interesantes adaptaciones para eliminar los taninos de sus sistemas digestivos. Por ejemplo, algunos mamíferos como los ratones y los conejos, producen proteínas en la saliva que tienen un alto contenido de prolina (25-45%), que posee una gran afinidad por los taninos. La secreción de estas proteínas es inducida por la ingestión de comida con un alto contenido de taninos, y su efecto es la disminución en una medida importante de los efectos adversos de la ingestión de taninos.³⁹ La alta cantidad de residuos de prolina le otorga a estas proteínas una conformación muy flexible y abierta, y un alto grado de hidrofobia que facilita su unión con los taninos.^{37, 40}

Los taninos de las plantas también funcionan como defensas contra los microorganismos. Por ejemplo, la madera muerta de muchos árboles contiene altas concentraciones de taninos que ayudan a prevenir el desmoronamiento por ataques de hongos y bacterias patógenas.³⁷

❖ **Propiedades medicinales para el hombre**

Los taninos proporcionan a las plantas medicinales las siguientes propiedades:

- **Cicatrizante y antihemostático:** Los taninos cumplen una función cicatrizante al acelerar la curación de las heridas y hemostática, al detener el sangrado. La cicatrización se produce por la formación de las costras al unirse las proteínas con los taninos y crear un medio "seco" que impide el desarrollo de las bacterias. Al constreñir los vasos sanguíneos ayudan a la coagulación de la sangre, y por tanto contribuyen a la curación de las heridas.⁴¹⁻⁴³

- **Antidiarreico:** Por su acción astringente, (que contrae los tejidos y seca las secreciones) resultan eficaces en el tratamiento de la diarrea, contribuyendo a que el organismo pueda realizar deposiciones más secas. ^{31, 32, 41-43}
- **Antioxidantes:** Los taninos se consideran antioxidantes por su capacidad para eliminar los radicales libres, previniendo la aparición de numerosas enfermedades degenerativas, entre ellas el cáncer. ^{31, 32, 41, 42, 44}
- **Antibacterianas:** La función antibacteriana de los taninos se produce fundamentalmente al privar a los microorganismos del medio apropiado para que puedan desarrollarse. ^{32, 41-43}
- **Inhibidor enzimático:** Los taninos son inhibidores enzimáticos: bloqueo de la 5-lipoxigenasa (geraniína, corilagina); inhiben la enzima convertidora de angiotensina, activan la hialuronidasa, las glucosiltransferasas de los microorganismos implicados en la cariogénesis; los taninos elágicos y los taninos complejos inhiben la protein-kinasa C, etc. ³¹
- **Antídotos de venenos:** La capacidad que tienen estos principios de inhibir la absorción de los alimentos en el tubo digestivo es aprovechada, en caso de ingestión de productos venenosos, para impedir que los venenos entren en la corriente sanguínea. El ácido tánico se utiliza como contraveneno para precipitar las sustancias venenosas de los alcaloides y ciertas sales metálicas. Aunque la utilización de este componente por vía interna pueda producir síntomas gastrointestinales desagradables, su acción positiva en la neutralización de los venenos justifica su uso. ^{31, 32, 41, 42}
- **Hipocolesterolémico:** Los taninos reducen el colesterol al inhibir su absorción y expulsarlo a través de las heces. Se ha comprobado como la ingestión de plantas ricas en este componente como la uva o el aceite de oliva ha supuesto una reducción

de los niveles de colesterol " malo" (LDL) y triglicéridos y un aumento de "colesterol bueno" (HDL). ^{32, 41, 42}

❖ Los taninos en la industria

Los taninos son utilizados en la industria del curtido, industria de productos naturales, industria de los alimentos, tanto comidas como bebidas, industria cosmética, industria de pinturas, tintas, etc. ^{32, 41, 42}

Los taninos se utilizan en el curtido porque reaccionan con las proteínas de colágeno presentes en las pieles de los animales, uniéndolas entre sí, de esta forma aumenta la resistencia de la piel al calor, a la putrefacción por agua, y al ataque microbiano. ⁴¹

A parte de los usos medicinales, estos principios activos tienen su aplicación en la cosmética y resultan útiles para el cuidado externo de la piel, ayudando a la curación de granos, espinillas o a la eliminación de la grasa en las pieles que la presentan en demasía, etc. ^{41, 42}

❖ Toxicidad de los taninos

Las plantas que contienen taninos, utilizadas medicinalmente en las proporciones adecuadas, proporcionan remedios ideales para el tratamiento de muchas enfermedades, mencionadas anteriormente. Se desconoce si son los taninos o sus metabolitos los verdaderos agentes tóxicos. ^{31, 41, 42}

2.3. ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son sustancias que detienen o previenen una cadena de propagación oxidativa, mediante la estabilización del radical generado (radical libre).⁴⁵

2.3.1. RADICALES LIBRES

Los radicales libres son moléculas inestables porque contienen un electrón no apareado. Para poder convertirse en moléculas estables, los radicales libres buscan electrones de otras moléculas tales como el ADN, lípidos en las membranas celulares y en las proteínas de los tejidos corporales.⁴⁶ Cuando estas moléculas son atacadas por los radicales libres, su estructura molecular se altera. Estas moléculas alteradas se convierten entonces en radicales libres que buscan, atacan y dañan moléculas aledañas, continuando así una reacción en cadena que crea radicales libres y causa daños moleculares.⁴⁷ Los científicos creen que los radicales libres también podrían contribuir en muchas enfermedades y a la aceleración de los signos de envejecimiento.⁴⁸

La excesiva producción y/o exposición de un organismo a radicales libres induce en éste alteraciones biológicas potencialmente conducentes a un daño celular, denominado "estrés oxidativo".⁴⁹

Los radicales libres más comunes en el organismo son el radical superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno, que aunque no cumple con el requisito de tener electrones desapareados tiene la reactividad necesaria para ser considerado dentro del grupo.⁵⁰ El anión radical superóxido, puede actuar como agente oxidante en un medio hidrofóbico, como son las membranas celulares y como agente reductor en medio acuoso. A niveles intracelulares son reducidos por dismutación, lo que puede ocurrir espontáneamente

o puede ser catalizado por la enzima superóxido dismutasa (SOD). La dismutación del anión radical superóxido produce peróxido de hidrógeno ⁵¹ molécula que puede reaccionar con metales divalentes (libres o unidos a proteínas) actuando como especies prooxidantes generando el radical hidroxilo (reacción de Fenton), considerado el más dañino de los radicales oxigenados. En forma similar, puede reaccionar también con el grupo prostético de metaloproteínas conteniendo hierro (reacción de Haber-Weiss). El radical hidroxilo reacciona a altas velocidades con casi todo tipo de molécula en células vivientes incluyendo los azúcares, aminoácidos, fosfolípidos y bases del ácido desoxirribonucleico (DNA). ⁵² También pueden provenir de fuentes externas como el tabaco, la contaminación del aire, la radiación ultravioleta y la de alta energía, el ozono o ciertos medicamentos. ^{53, 54}

2.3.2. ANTIOXIDANTES NATURALES

❖ Antioxidantes y salud humana

En el organismo humano existe una gran variedad de sistemas de defensa antioxidante tanto enzimáticos como no enzimáticos, que se coordinan cooperativamente y protegen al organismo de los riesgos que conlleva el estrés oxidativo. Entre ellos se destacan las actividades enzimáticas de superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT); además del ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E), glutatión (GSH), beta-caroteno, vitamina A, flavonoides y polifenoles. ⁵⁵

La vida en presencia del oxígeno molecular exige contar con una batería múltiple de defensas contra los diversos radicales libres de oxígeno, que por un lado tiendan a impedir su formación y por otro lado los neutralicen una vez formados. Para preservar la integridad celular, los organismos aeróbicos disponen de diversos mecanismos de defensa

antioxidante, los cuales permiten minimizar los efectos nocivos causados por los agentes oxidantes.⁵⁶

Los sistemas antioxidantes se encuentran estratégicamente ubicados en organelos subcelulares para proporcionar la máxima protección y una interacción más adecuada con el compartimento extracelular. Han sido tradicionalmente denominados: defensas no enzimáticas (vitaminas: A, E, C, albúmina, ácido úrico), coenzima Q10 o ubiquinona)⁵⁷⁻⁶⁰ y defensas enzimáticas (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa).⁶¹ Las defensas no enzimáticas, interaccionan directamente con radicales libres generados desde el oxígeno, ($O_2^{\cdot -}$), así como también del producto de su dismutación, mientras las defensas enzimáticas actuarían en la reparación o eliminación de estructuras biológicas dañadas.⁶⁰

Se cree que los antioxidantes son esencialmente importantes para el organismo por la capacidad que tienen de proteger a las macromoléculas biológicas contra el daño oxidativo.⁶² La manera de lograrlo es cediendo electrones a los radicales libres, lo cual detiene efectivamente el ciclo dañino. El cuerpo humano produce antioxidantes de manera natural, tales como la dismutasa, catalasa y la glutatión peroxidasa.⁶³

❖ Antioxidantes y alimentos

Los antioxidantes son compuestos que al retardar o inhibir la degradación oxidativa de las moléculas orgánicas, ayudan a prevenir la formación de colores y olores desagradables en alimentos; estos pueden ser de origen natural o sintético, pero la mayoría de los utilizados comercialmente son de origen sintético. Debido a que algunos de los antioxidantes sintéticos, son altamente inestables bajo las condiciones de trabajo y en ciertos casos

ocasionan efectos adversos sobre la salud de animales de experimentación, los investigadores han intentado encontrar sustancias más estables, eficaces, versátiles y/o menos tóxicas. Para cumplir con este objetivo, se han obtenido diferentes tipos de compuestos a partir de rutas sintéticas o fuentes naturales. Así por ejemplo, entre los compuestos de origen natural se encuentran: carotenoides, vitamina C y E, tocoferoles, tocotrienoles, flavonoides y licopenos, entre otros.⁶⁴

❖ **Antioxidantes y metabolitos de plantas**

Nuestro organismo posee antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para protegerse de estos radicales, sin embargo otra fuente muy importante de ellos son las plantas, y precisamente el estudio de estos compuestos es prioritario por su rol en la protección del cuerpo humano en contra de un número considerable de enfermedades degenerativas, las evidencias experimentales sugieren que protegen de manera importante las funciones biológicas de las células en contra de la actividad de los radicales libres (estrés oxidativo).⁶⁵

66

Hay un creciente interés sobre el uso de antioxidantes no vitamínicos, tales como los compuestos flavonoides y polifenoles los cuales promueven la reducción de los efectos negativos del estrés oxidativo y atenúan la acción de los radicales libres.⁶⁷

❖ **Compuestos fenólicos y actividad antioxidante**

Los antioxidantes en forma general son flavonoides o compuestos fenólicos que están presentes en diferentes extractos vegetales.²

Los compuestos fenólicos son sustancias orgánicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Se sintetizan como metabolitos secundarios con funciones de defensa, y son en gran medida responsables de las propiedades del color, la astringencia y el flavor (sabor y aroma) de los vegetales. Todos tienen en su estructura uno o más anillos aromáticos con al menos un sustituyente hidroxilo.⁶⁸ Su estructura química es propicia para secuestrar radicales libres, debido a la facilidad con la que el átomo de hidrógeno desde el grupo hidroxilo aromático puede ser donado a la especie radical, y a la estabilidad de la estructura quinona resultante que soporta un electrón desapareado. (Gráfico N° 4)⁶⁹

La actividad antioxidante de los polifenoles depende del número y la localización de los grupos hidroxilo que contienen en su estructura.^{70, 71}

Fuente: Pannala, A.; Chan, T.; O'Brien, P.; Rice-Evans, C. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast-reaction kinetics. Biochem. Biophys. Res. Com. 2001.⁶⁹

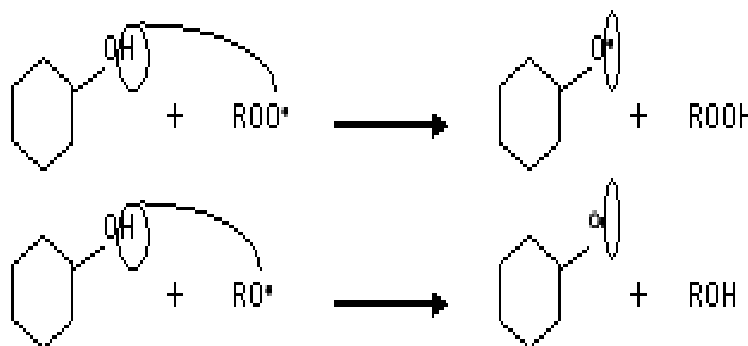


Gráfico N° 4. Acción de compuestos fenólicos frente a radicales libres (ROO^\bullet , RO^\bullet)

Estudios realizados con compuestos polifenólicos y especialmente los flavonoides demuestran su capacidad antioxidante y su significativa contribución en la dieta, así como su efecto en la prevención de diversas enfermedades tales como: enfermedades cardiovasculares, cancerígenas y enfermedades neurológicas.⁷²⁻⁷⁸

Adicionalmente, compuestos fenólicos como los tocoferoles, tocotrienoles y flavonoides presentan una alta capacidad de capturar radicales, por lo que en muchas ocasiones resulta de gran utilidad la evaluación del contenido total de fenoles, ya que de esta forma se podría determinar la relación entre esta y el IC₅₀.⁷⁹

2.4. ANTIMICROBIANOS NATURALES

❖ Metabolitos de plantas como agentes antimicrobianos

Las plantas producen una gran cantidad de compuestos secundarios como protección contra ataques microbianos e insectos. De hecho muchos de éstos compuestos han sido usados en forma pura o extractos vegetales, como alimento o aplicaciones médicas en humanos.⁸⁰

Las plantas tienen una capacidad casi ilimitada para sintetizar sustancias aromáticas, siendo la mayoría fenoles o sus derivados oxígeno-sustituidos. En general son metabolitos secundarios (es decir, que no tienen un papel esencial en el metabolismo de las plantas),⁸¹ de los cuales por lo menos el 10 % se han aislado. En muchos casos estas sustancias sirven a la planta como mecanismos de defensa contra el ataque de microorganismos, insectos y herbívoros.⁸²

Los compuestos derivados de plantas que poseen actividad antimicrobiana son los fenólicos y polifenoles dentro de los cuales se encuentran: quinonas, flavonoides, taninos y cumarinas. Otros son los terpenoides, aceites esenciales, los alcaloides, lecitinas y polipéptidos, entre otros.⁸²

III. SECCIÓN EXPERIMENTAL

3.1. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

3.1.1. Estudio farmacognóstico

❖ MATERIALES

- ✓ Cubas de revelado
- ✓ Cromatofolios con Silicagel GF 254
- ✓ Pulverizador para cromatografías
- ✓ Capilares para cromatografía
- ✓ Frascos ámbar, capacidad 2 L
- ✓ Pera de decantación
- ✓ Cápsula de porcelana
- ✓ Baguetas
- ✓ Embudos de vidrio (PIREX)
- ✓ Placa de toques
- ✓ Pipetas de 1, 2, 5, 10, 20 mL (FORTUNA WGC)
- ✓ Beakers de 25, 50, 100, 500 mL (KIMAX)
- ✓ Fiolas de 10, 25, 50, 100 mL (PIREX)
- ✓ Probetas de 50, 100, 250 mL (PIREX)
- ✓ Matraces de 50, 250, 500 mL. (KIMAX)
- ✓ Papel filtro
- ✓ Tubos de prueba
- ✓ Placas de vidrio

❖ EQUIPOS

- ✓ Equipo de reflujo
- ✓ Estufa (Mettler)
- ✓ Microscopio óptico
- ✓ Balanza electrónica 1 mg - 200 g (OHAUS Pioneer)
- ✓ Balanza capacidad 1g - 2 kg (OHAUS stainless)
- ✓ Lámpara UV 365 nm
- ✓ Potenciómetro, pH 1- 14 (Shanghai Precision & Scientific)
- ✓ Espectrofotómetro UV-visible (Spectroquant Pharo 300 Merck)

❖ REACTIVOS

a) Reactivos cromógenos

- ✓ Rvo. Molish
- ✓ Rvo. Fehling
- ✓ Rvo. Vainillín sulfúrico
- ✓ Rvo. Mayer
- ✓ Rvo. Dragendorff
- ✓ Rvo. Solución de yodo 1 %
- ✓ Rvo. Nitroprusiato de sodio
- ✓ Rvo. Ninhidrina 1 %
- ✓ Rvo. Cloruro de mercurio
- ✓ Rvo. Liebermann Burchard
- ✓ Rvo. Shinoda
- ✓ Rvo. Borntranger
- ✓ Rvo. Keller-killiani
- ✓ Rvo. Tricloruro de hierro 5 %
- ✓ Rvo. Gelatina 1 %
- ✓ Rvo. Bicromato de potasio 5 %
- ✓ Rvo. Solución de atropina 1 %
- ✓ Rvo. Polvo de piel
- ✓ Rvo. Acetato de zinc 5 %
- ✓ Rvo. Amoníaco
- ✓ Rvo. Acetato de plomo 5 %
- ✓ Rvo. Formol clorhídrico
- ✓ Rvo. Agua de bromo saturado
- ✓ Rvo. Ferrocianuro de potasio y amonio

b) Solventes

- ✓ Éter etílico
- ✓ N-hexano
- ✓ Cloroformo
- ✓ Acetato de etilo
- ✓ Dietilamina
- ✓ Ácido fórmico
- ✓ Alcohol amílico
- ✓ Tolueno
- ✓ Butanol
- ✓ Hidróxido de amonio
- ✓ Ácido acético glacial
- ✓ Ácido clorhídrico
- ✓ Propanol
- ✓ Etanol absoluto
- ✓ Metanol
- ✓ Agua desionizada

c) Reactivos para cuantificación de taninos y taninos condensados

- ✓ Tungstato de sodio dihidratado (Merck)
- ✓ Gelatina (Aldrich Chemical Co.)
- ✓ Carbonato de sodio
- ✓ Ácido fosfomolibdico hidratado (Merck)
- ✓ Caolín
- ✓ Cloruro de sodio
- ✓ Ácido clorhídrico QP (Merck)
- ✓ Ácido fosfórico 85 % (Merck)
- ✓ Sulfato ferroso heptahidratado

3.1.2. Análisis toxicológico

a) Materiales

- ✓ Balanza para pesar animales de experimentación
- ✓ Jeringas descartables de 1 mL y 5 mL
- ✓ Jaulas para animales
- ✓ Cánula intragástrica

b) Material biológico

Se han utilizado 20 ratas albinas Sprague Dawley, con una masa corporal de 200 ± 20 g y edad de $7,5 \pm 0,5$ semanas. Los animales se mantuvieron en el Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, a una temperatura de $20 \pm 2^\circ$ C, con una humedad relativa entre 70 y 80% y ciclos luz/ oscuridad de 12/ 12 horas. Recibieron como alimento dieta balanceada, y agua apta para consumo humano. El acceso a los alimentos y al agua fue *ad libitum*. Los animales fueron sometidos a cuarentena e inspección clínica durante una semana antes del inicio del experimento, evitando el estrés.

3, 82-85

3.1.3. Actividad antioxidante

a) Materiales

- ✓ Tubos de prueba
- ✓ Baguetas
- ✓ Beacker 500 mL (PIREX)
- ✓ Pipetas de 1, 2 y 5 mL (FORTUNA)
- ✓ Micropipetas de 2 y 5 mL (BRAND)
- ✓ Matraces de 100 y 250 mL (KIMAX)
- ✓ Fiolas de 10, 25, 50 y 100 mL (PIREX)

b) Equipos

- ✓ Espectrofotómetro (Spectroquant Pharo 300 MERCK)

c) Soluciones

- ✓ Solución de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) en metanol (20 mg/L)
- ✓ Metanol QP (Aldrich Chemical Co.)
- ✓ Etanol absoluto (Merck)

3.1.4. Actividad antimicrobiana

a) Materiales

- ✓ Placas de Petri
- ✓ Pinza estéril
- ✓ Pipetas de 1, 2 y 5 mL (PIREX)
- ✓ Fiolas de 10, 25, 50 y 100 mL (PIREX)
- ✓ Hisopos estériles
- ✓ Tubos de prueba
- ✓ Papel filtro Whatman

b) Equipos

- ✓ Incubadora a 37° C (Precision Stainless)
- ✓ Autoclave (Precision Stainless)

c) Soluciones

- ✓ Solución fisiológica 0.85 %
- ✓ TSA (Agar Trypticase Soya) (Merck)
- ✓ Medio Sabouraud (Merck)
- ✓ Agua peptonada 0.1 % (Merck)
- ✓ Caldo Mueller Hinton (Merck)
- ✓ Agua desionizada

d) Estándares

- ✓ Discos de sensibilidad con estándar de Metromidazol
- ✓ Discos de sensibilidad con estándar de Cloranfenicol

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Recolección y selección de la droga

El material objeto de nuestro estudio está constituido por la corteza de la especie *Triplaris americana* L. (Polygonaceae), planta femenina, recolectada en el pueblo de Chazuta, provincia de Tarapoto, departamento de San Martín; en época de verano, etapa de floración. La recolección se realizó con una elevación de 900 a 1000 metros y coordenadas: 06°50'S 076° 60' W. La identificación de la planta fue verificada por el biólogo José Ricardo Campos De La Cruz (C.B.P. 3796)

Se realizó la selección de la corteza trozada en buen estado, separando las impurezas y posibles contaminantes, conservándose en frascos ámbar con tapa de capacidad de 2 Litros.

3.2.2. Análisis histoquímico

En el estudio micromorfológico de la corteza, se realizaron cortes transversales a mano libre, en los cuales se observaron los caracteres anatómicos internos. El análisis fue realizado en la Cátedra de Botánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de UNMSM y se empleó para el análisis un microscopio óptico.

Con el objeto de determinar la localización de las proantocianidinas, se efectuaron cortes sobre partes de la corteza de tangarana colorada. Posteriormente se efectuó sobre ellos la reacción de la vainillina-HCl. Las células que contienen proantocianidinas tomaron un intenso color rojizo.⁸⁶⁻⁸⁸

3.2.3. Estabilización de la droga

La muestra se ha puesto a temperatura normal, en ambiente cerrado, completándose la desecación en estufa a 54° C por dos semanas, hasta obtener peso constante; una vez desecada, fue pulverizada con un molino de cuchillas marca “Standard Model NOS-Wiley Mill”, provisto de tamiz con un diámetro de luz malla de 2 mm. La droga pulverizada fue almacenada en un ambiente libre de humedad en envases cerrados, hasta el momento de la preparación del correspondiente extracto para todo el estudio, como se muestra en el Esquema N° 1.

3.2.4. Obtención y tratamiento del extracto

Mil cuatrocientos gramos (1400 g) de la corteza seca y molida de la planta fueron macerados en aproximadamente 5 L de alcohol etílico 70° durante 10 días, la solución resultante se filtró y concentró a sequedad total en la estufa marca “Memmert”, a una temperatura constante de 40° C; obteniéndose como rendimiento 22.14 % (gramos de extracto seco/ 100 gramos de planta)

3.2.5. Estudio farmacognóstico

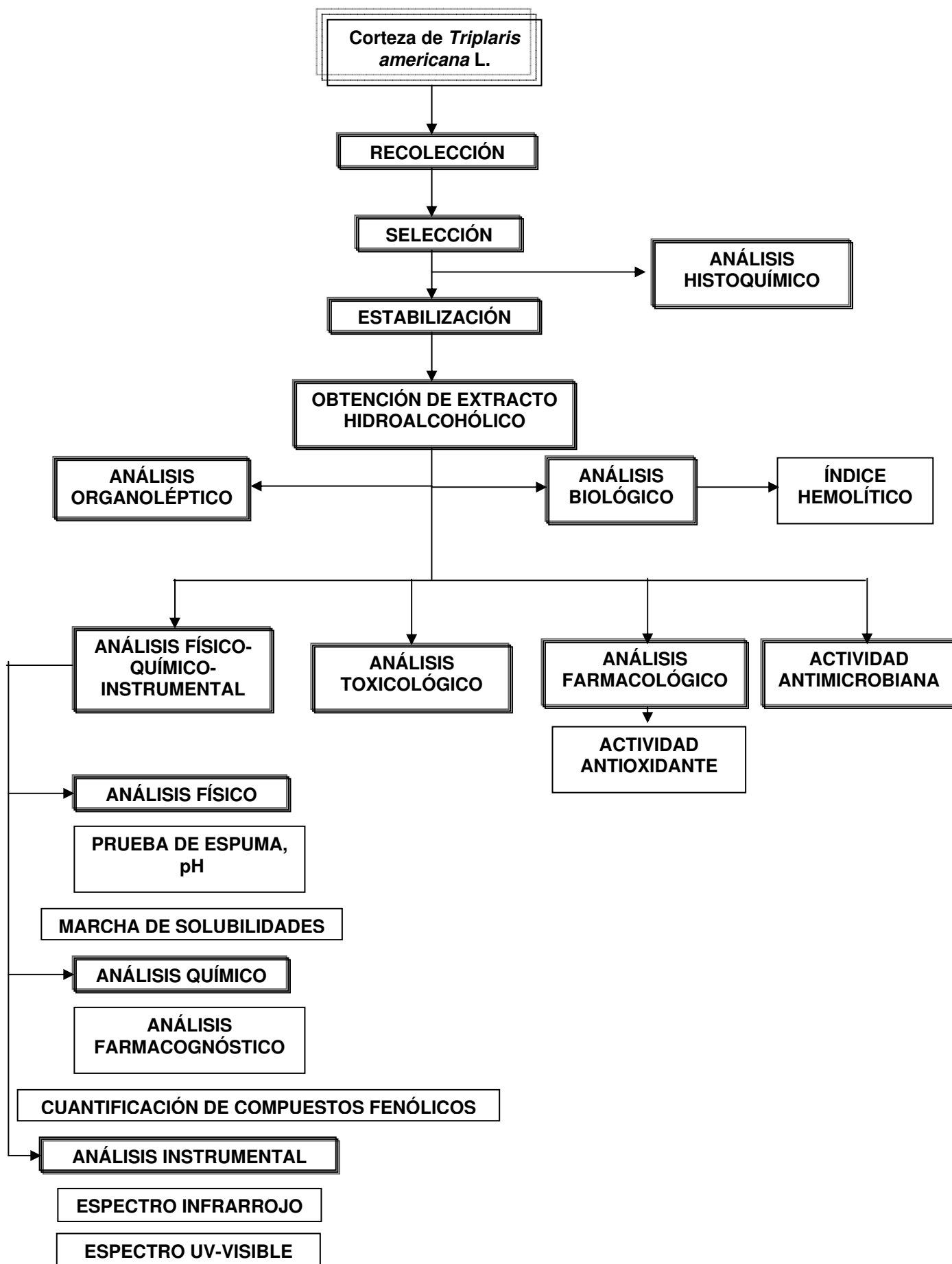
3.2.5.1. Ensayos preliminares

Con la finalidad de detectar los diferentes constituyentes químicos del extracto hidroalcohólico desecado, se emplearon los siguientes ensayos: ⁹⁰

a) Ensayo organoléptico

Se realizó la caracterización organoléptica del extracto hidroalcohólico desecado, considerando aspecto, color, olor y sabor.

Esquema N° 1. Estudio global de la corteza de Tangarana colorada.



b) Ensayo biológico

- Índice hemolítico (IH)

En placa de Petri con medio agar sangre, se colocan discos estériles embebidos con el extracto hidroalcohólico desecado disuelto en agua desionizada, al 10 %.

c) Ensayo físico

- Índice afrosimétrico (Prueba de la espuma)

El extracto hidroalcohólico desecado disuelto en agua desionizada, al 10 %, fue colocado en tubos de ensayos diferentes con un volumen doble de agua desionizada, se agitó y se dejó en reposo por media hora.

- Determinación de pH

Se midió el pH del extracto hidroalcohólico, mediante potenciómetro electrónico, marca Shangai Precisión & Scientific.

- Marcha de solubilidades

En una batería de tubos de ensayo se colocó una pequeña porción del extracto hidroalcohólico desecado de la corteza y se le agregó a cada uno 2 mL del solvente, en el siguiente orden: Éter etílico, N-hexano, tolueno, cloroformo, acetato de etilo, dietilamina, butanol, propanol, etanol, metanol, ácido acético y agua desionizada, se agitó vigorosamente.

3.2.5.2. Screening farmacognóstico

- Ensayos de coloración

Se han realizado pruebas de color, en tubos de ensayo para determinar si existe presencia o ausencia de metabolitos primarios y secundarios más importantes, mediante la marcha farmacognóstica preliminar, según Lock, O.,⁹² tal como se muestra en el Esquema N° 2.^{31-34, 89-92}

Esquema N° 2. Estudio farmacognóstico del extracto hidroalcohólico.

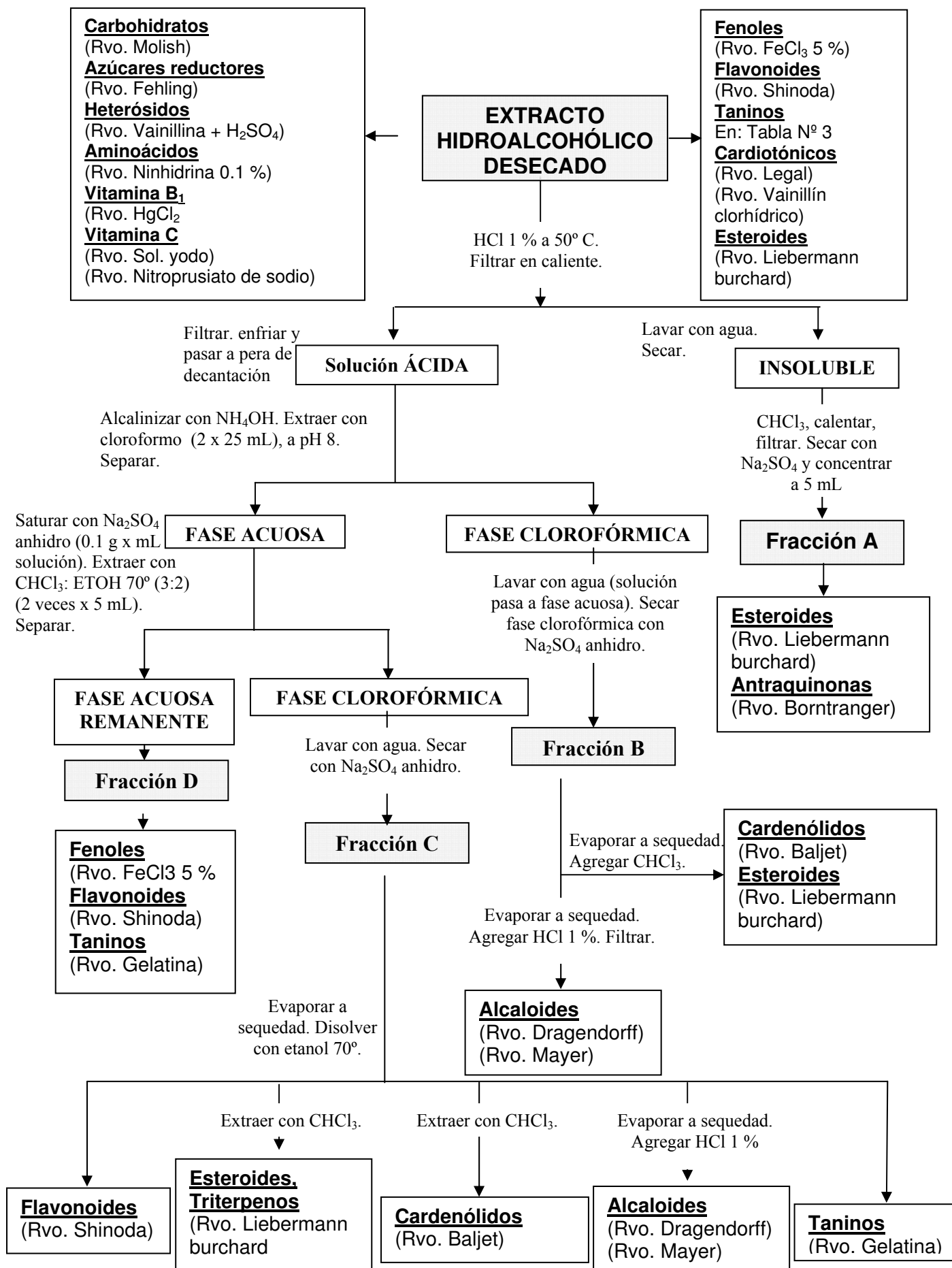


Tabla N° 3. Ensayos de caracterización para taninos.

Tricloruro de fierro (III) 5 %	Gelatina 1 %
Bicromato de potasio 5 %	Polvo de piel
Acetato de plomo 5 %	Prueba de catequina
Formol clorhídrico	Acetato de zinc
Agua de bromo saturado	Ferrocianuro de potasio y amoníaco
Solución atropina 1 % en agua desionizada.	Amoníaco

3.2.5.3. Análisis cromatográfico

❖ Fundamento

Permite aislar componentes de mezcla de solutos, basada en la diferencia de la velocidad de migración de cada uno de los componentes, a través de la fase estacionaria, arrastrada por la fase móvil.^{93, 94}

❖ Cromatografía en capa fina.

Se han utilizado cromatofolios con Silicagel GF₂₅₄, en el cual se aplica el extracto hidroalcohólico, utilizando capilares nuevos; posteriormente colocados en cámaras de separación cromatográfica, previamente saturada con los sistemas de solventes que se ensayaron previamente, en los siguientes sistemas:

a) Para sustancias polares

- Acetato de etilo/ ácido acético glacial/ ácido fórmico/ agua (100:11:11:26)
(5:0.55:0.55:1.3)
- Acetato de etilo/ agua/ ácido fórmico (15:3:2)
- Acetato de etilo/ metanol/ agua (100:13.5:10) (80:10:5) (30:3:1) (180:10:5) (150:18:3)
(45:2.5:0.5) (77:15:8)

- Ácido acético/ ácido clorhídrico/ agua (30:3:10)
- Ácido acético/ etanol 96°/ agua (4:5:1)
- Ácido clorhídrico 1 %
- Ácido fórmico/ ácido clorhídrico/ agua (5:2:3)
- Agua/ ácido acético glacial/ ácido clorhídrico 2N (82:15:3)
- Alcohol amílico/ ácido acético/ agua (2:1:1)
- Cloroformo/ acetona/ ácido fórmico (15:13:17)
- Cloroformo/ acetona (9:1)
- Cloroformo/ ácido acético glacial/ metanol/ agua (64:32:12:8)
- Cloroformo/ metanol/ agua (32: 25: 5)
- Cloroformo/ metanol/ agua (13:7:20)
- Metanol/ ácido acético/ agua (9:1:1)
- N-butanol/ acetato de etilo/ agua (4:1:5)
- N-butanol/ ácido acético/ acetato de etilo (3:1:4)
- N-butanol/ etanol 96°/ agua (1:1:1)
- N-butanol/ Ácido acético glacial/ Agua (4:1:2) (4:1:5) fase superior

b) Para sustancias apolares

- Cloroformo/ acetato de etilo/ ácido fórmico (5:4:1)
- Dietilamina/ cloroformo (2:1)
- N-hexano/ acetato de etilo (1:1)
- N-hexano/ cloroformo (9:1)
- Tolueno/ acetato de etilo (93:7)
- Tolueno/ acetato de etilo/ ácido fórmico (8:2:1)
- Tolueno/ acetato de etilo/ etanol 96° (7:1:2)

Resultando como mejores solventes:

- Acetato de etilo/ metanol/ agua (100:13.5:10) y (77:15:8) (**glicósidos, flavonoides**)
- N-butanol/ ácido acético/ agua (4:1:5) (tomar fase superior) (**flavonoides, taninos**)

Estos cromatofolios fueron revelados con: Rvo. Dragendorff (alcaloides), Rvo. Potasa alcohólica 5% (antracenos, flavonoides, cumarinas, naftoquinonas), Rvo. Tricloruro de fierro 1% (fenólicos), Rvo. Liebermann–Burchard, Rvo. Vainillín sulfúrico (saponinas, lactonas sesquiterpénicas), Rvo. Tricloruro de aluminio (flavonoides), luz UV a 254 nm.

3.2.5.4. Caracterización y conversión de proantocianidinas en antocianidinas.

La conversión de proantocianidinas en antocianidinas se efectuó mediante tratamiento ácido. Se tomó 1 gramo del extracto hidroalcohólico desecado en un tubo de ensayo y, se disolvió en 50 mL de HCl 2N. Luego se colocó el tubo con la solución en un baño María a 100 °C durante una hora. Las proantocianidinas se transformaron así en antocianidinas, y fueron extraídas en alcohol amílico. El color rojo intenso que presentó la fase amílica sugiere la presencia de antocianidinas.^{86, 95- 97}

De la solución amílica, se separó 20 mL y concentró a sequedad; para análisis espectrofotométrico IR y UV-visible.

3.2.5.5. Análisis UV-Visible e Infrarrojo

a) Espectroscopía UV-Visible

El espectro UV del extracto hidroalcohólico desecado fue leído en metanol y en alcohol amílico para el aislado amílico de su hidrolizado; análisis realizado en el Instituto del Mar del Perú (IMARPE), por la Ingeniera Química Violeta León.

b) Espectroscopía Infrarroja (IR)

El extracto hidroalcohólico desecado y el aislado amílico de su hidrolizado, fueron analizados mediante el método de la Espectroscopía infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), realizado en el servicio USAQ de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2.5.6. Cuantificación de compuestos fenólicos mediante método espectrofotométrico.

a) Fundamento

El método se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin (tungstato-fosfomolibdico; carbonato de sodio al 20 %) el cual produce un complejo color azul, cuya extinción es medida a 700 nm, determinándose el contenido total de fenoles. Posteriormente se utiliza una solución de gelatina al 25 % para garantizar el secuestro de los taninos, obteniéndose de la diferencia de ambas determinaciones el porcentaje de taninos reportados como ácido tánico.^{98, 99}

b) Diseño experimental

El extracto hidroalcohólico desecado fue diluido en agua desionizada pasteurizada (30 mg %).

El método consta de 2 etapas: la etapa (A) donde se cuantifican los polifenoles totales en el extracto hidroalcohólico desecado, y la etapa (B) donde se cuantifican los polifenoles residuales después del secuestro de los taninos con gelatina.

❖ Solución tungstato-fosfomolibdico

Se disolvieron 10 g de tungstato de sodio dihidratado, 0.2 g de ácido fosfomolibdico hidratado y 5.0 mL de ácido fosfórico al 85 % en 75 mL de agua desionizada pasteurizada. La solución se reflujo por 2 hora (hasta aparición de color amarillo; no verde, ni azul) y se completó con agua desionizada pasteurizada a 100 mL.

❖ ENSAYO A: CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

Se midieron exactamente 4 mL del extracto y fueron transferidos a un matraz aforado de 250 mL, diluyendo con agua desionizada pasteurizada hasta enrase. De la solución anterior se tomaron porciones de 1, 2, 3, 4 y 5 mL y se llevaron a matraces aforados de 25 mL; a cada matraz, se agregó 2 mL de solución tungstato-fosfomolibdico, se agitó y se dejó reposar durante 5 minutos. Luego se añadió 1 mL de solución de carbonato de sodio al 20 %, se agitó, enrasó con agua desionizada pasteurizada y homogenizó. Se lee la absorbancia de las soluciones a 700 nm después de transcurridos 2 minutos de la reacción.

❖ ENSAYO B: CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES RESIDUALES

Se midieron exactamente 20 mL del extracto y fueron transferidos a un matraz aforado de 250 mL con tapa, adicionándole posteriormente 60 mL de agua desionizada pasteurizada, 50 mL de solución de gelatina al 25 %, 100 mL de solución saturada de

cloruro de sodio acidificado y 10 g de caolín y luego enrasado con agua desionizada pasteurizada. Se tapó y agitó durante 1 hora, dejándose reposar para posteriormente filtrar. Del filtrado se toman 10 mL y se transfirieron a un matraz aforado de 50 mL completando con agua desionizada pasteurizada. Luego se tomaron 1, 2, 3, 4 y 5 mL y se llevaron a matraces aforados de 25 mL; a cada matraz, se agregó 2 mL de solución tungstato-fosfomolibdico, se agitó y se dejó reposar durante 5 minutos. Luego se añadió 1 mL de solución de carbonato de sodio al 20 %, se agitó, enrasó con agua desionizada pasteurizada y homogenizó. Se lee la absorbancia de las soluciones a 700 nm después de transcurridos 2 minutos de la reacción.

❖ SUSTANCIA DE REFERENCIA

Se pesó 25 mg de ácido tánico, se transfirieron a un matraz aforado de 100 mL y se completó el volumen con agua desionizada pasteurizada. Posteriormente se midieron exactamente 20 mL y se pasaron a un matraz aforado de 100 mL enrasando con agua desionizada pasteurizada. De la solución anterior se transfirieron 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 mL a matraces aforados de 25 mL; a cada matraz, se agregó 2 mL de solución tungstato-fosfomolibdico, se agitó y se dejó reposar durante 5 minutos. Luego se añadió 1 mL de solución de carbonato de sodio al 20 %, se agitó, enrasó con agua desionizada pasteurizada y homogenizó. Se lee la absorbancia de las soluciones a 700 nm después de transcurridos 2 minutos de la reacción.

❖ Blanco (MÉTODO A)

Se añaden 1, 2, 3, 4 y 5 mL de agua desionizada pasteurizada a matraces aforados de 25 mL; a cada matraz, se agregó 2 mL de solución tungstato-fosfomolibdico, se agitó y se dejó reposar durante 5 minutos. Luego se añadió 1 mL de solución de carbonato de sodio al

20 %, se agitó, enrasó con agua desionizada pasteurizada y homogenizó. Se lee la absorbancia de las soluciones a 700 nm después de transcurridos 2 minutos de la reacción.

❖ **Blanco (MÉTODO B)**

Se adicionaron 80 mL de agua desionizada pasteurizada, 50 mL de solución de gelatina al 25 %, 100 mL de solución saturada de cloruro de sodio acidificada y 10 g de caolín, y enrasar con agua en un matraz aforado de 250 mL con tapa. Se tapó y agitó durante 1 hora, se dejó reposar para posteriormente filtrar. Del filtrado se tomaron 10 mL y se transfirieron a un matraz aforado de 50 mL, enrasando con agua desionizada pasteurizada, del que se tomaron 1, 2, 3, 4 y 5 mL y se llevaron a matraces aforados de 25 mL; a cada matraz, se agregó 2 mL de solución tungstato-fosfomolibdico, se agitó y se dejó reposar durante 5 minutos. Luego se añadió 1 mL de solución de carbonato de sodio al 20 %, se agitó, enrasó con agua desionizada pasteurizada y homogenizó. Se lee la absorbancia de las soluciones a 700 nm después de transcurridos 2 minutos de la reacción.

c) Validación del método analítico

Para la validación del método propuesto se siguieron normativas reconocidas de validación.⁹⁸⁻¹⁰⁸

❖ **ESPECIFICIDAD**

La especificidad del método está basada en la especificidad de la gelatina por los taninos^{109, 110}, por lo cual los taninos son determinados por la diferencia del contenido total de fenoles y fenoles residuales luego del secuestro por gelatina.

Con el objetivo de corroborar la eficacia del secuestro de los taninos por la gelatina, se realizó un análisis por cromatografía en capa fina. Se puntearon microlitros del extracto

hidroalcohólico, el extracto tratado con gelatina 5% y el ácido tánico, como el patrón tratado con gelatina 5% en cromatofolios con silicagel GF₂₅₄, para luego realizar la separación de sustancias por la fase móvil: acetato de etilo: metanol: agua (100: 13.5: 10). Luego fueron evaluados con reveladores como el tricloruro de hierro (III) 1%, ácido fosfomolibdico 5% y el reactivo de Folin, el cual se emplea en el desarrollo de color del presente método.

❖ LINEALIDAD

Para comprobar la linealidad del método analítico se probó la linealidad de la sustancia de referencia (ácido tánico) en un rango de concentraciones de 1 a 20 ppm, calculándose la recta de regresión, el coeficiente de correlación, el coeficiente de variación de los factores respuestas, y los tests de linealidad y proporcionalidad. Los resultados fueron procesados por el programa Microsoft Excel 2003 y Stat Plus 2008.¹¹¹⁻¹¹³

La linealidad para las etapas A y B del método fueron analizadas, realizándole las mismas evaluaciones.

❖ PRECISIÓN

Este parámetro incluye la repetibilidad y reproducibilidad.

○ REPETIBILIDAD

La repetibilidad se comprobó con 15 réplicas de ensayo, evaluándose el coeficiente de variación.

○ REPRODUCIBILIDAD

Para el análisis de la reproducibilidad se realizaron 6 réplicas por analista, en 2 días de análisis; realizándose 12 determinaciones en total, a las cuales se les determinó el coeficiente de variación y las pruebas estadísticas de *Fisher* y *Student*.

❖ **EXACTITUD**

Para el estudio de la exactitud se empleó el método de adición de patrón a diferentes niveles: 2, 2.5 y 3 ppm (80, 100 y 120 %). Aplicándose las pruebas "t" de Student y la "G" de Cochran para determinar si existen diferencias significativas entre la recuperación media y el 100 % y si el factor concentración tiene alguna influencia en los resultados.

3.2.5.7. CUANTIFICACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS

❖ **Determinación de taninos condensados (Método de la proantocianidina)**

Se siguió el método de Waterman, P.^{86, 87, 95, 96}

❖ **Solución reactivo para taninos condensados**

Se prepara agregando 0.7 gramos de sulfato ferroso heptahidratado a 50 mL de ácido clorhídrico concentrado, llevando a 1000 mL con butanol.

❖ **Obtención de muestra y estándar para análisis**

Se preparó una solución de extracto hidroalcohólico desecado en agua desionizada pasteurizada (100 mg %). Se colocan 100, 250, 500 µL del extracto diluido, en tubos con tapa rosca.

Se pesó 15 mg de ácido tánico, se transfirieron a un matraz aforado de 100 mL y se completó con agua desionizada pasteurizada. Posteriormente se midieron exactamente 10 mL y se pasaron a un matraz aforado de 100 mL enrasando con agua desionizada pasteurizada. De la solución anterior se transfirieron 100, 200, 300, 400 y 500 µL, en tubos con tapa rosca.

❖ Tratamiento de la muestra y estándar

Luego se agregaron 7 mL del reactivo a cada tubo (estándar y extracto) y se llevó a ebullición en baño de agua por 40 minutos. Se enfrió y midió la absorbancia a 550 nm.

❖ Análisis estadístico

Los resultados se expresan como gramos de ácido tánico / 100 gramos de corteza (\pm Desviación Standard). Para el análisis estadístico se empleó el programa Microsoft Excel 2003.¹¹¹⁻¹¹³

3.2.6. Evaluación de la toxicidad aguda a dosis límite

En diciembre del 2002 quedó abolida por la OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) la ejecución del test clásico para la determinación de toxicidad aguda y la dosis letal 50 (DL₅₀) que fue sustituido por tres métodos alternativos cuyo objetivo común es reducir el número de animales empleados y minimizar el sufrimiento de éstos, estos métodos comprenden el test de Clasificación Tóxica Aguda o Método de las Clases de Toxicidad (Toxic Class Method, TCM), Procedimiento de Sube y Baja (Up-and-Down Method, UDP) y procedimiento de Dosis Fijas (Fixed Dose Procedure, FDP).^{83, 114, 115}

El procedimiento de Dosis Fijas fue adoptado en la Guía N°. 420 de la OECD¹¹² como alternativa a la prueba clásica aguda. El método se basa en la evaluación de dosis prefijadas (25, 200 y 2000 mg/kg) para discernir la clasificación tóxica de una sustancia según el Sistema Global Armonizado (SGA).¹¹⁶ La dosis seleccionada debe ser no letal, no dolorosa y no estresante, además de no ser corrosiva ni severamente irritante.⁸³

❖ **Fundamento**

La toxicidad aguda a dosis única se evaluó mediante el método alternativo procedimiento de Dosis Fijas (PDF), internacionalmente validado y aceptado.¹¹⁵ La toxicidad a dosis única imprescindible en la estimación del potencial tóxico de una sustancia, consiste en un estudio cuali-cuantitativo de los fenómenos tóxicos y de su aparición en función del tiempo tras la administración de una dosis única de la sustancia o de varias dosis fraccionadas en el transcurso de 24 horas.¹¹⁷

❖ **Preparación de la muestra**

Se utilizó el extracto hidroalcohólico desecado de la corteza, disuelto en agua desionizada pasteurizada.

❖ **Diseño experimental**

Aleatoriamente se conformaron cuatro grupos experimentales, dos grupos tratados (01 grupo de machos y 01 grupo de hembras) y dos controles (01 grupo de machos y 01 grupo de hembras). La muestra fue administrada con un ayuno previo de 24 horas por vía oral mediante cánula intragástrica, a dosis única de 2000 mg/kg de masa corporal, teniendo en cuenta la ausencia de signos o síntomas de toxicidad por esta vía de administración. Se dosificaron de acuerdo al peso de cada rata, administrándoles un volumen de 2 mL del extracto hidroalcohólico desecado disuelto en agua desionizada pasteurizada; y 2 mL del solvente para los grupos controles.

Los animales fueron observados individualmente durante los primeros 30 minutos, con especial atención durante las primeras 4 horas y diariamente hasta los 14 días del experimento, recogiendo signos de toxicidad.

Las observaciones estuvieron dirigidas a la determinación de: muerte y tiempo de ocurrencia de la misma, signos de toxicidad incluyendo su comienzo y duración, además de cambios en la piel, membranas de mucosas y ojos, en el sistema respiratorio, en el circulatorio, en el nervioso central y en el autónomo, en la actividad somatomotora y en la conducta. Se prestó especial atención a la potencial ocurrencia de temor, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, somnolencia y coma.¹¹⁸

Se controló el peso vivo de los animales en los días 1, 7 y 14 del experimento como uno de los parámetros demostrativos de toxicidad.

3.2.7. Evaluación de la actividad antioxidante

Se conocen diversos métodos para determinar la capacidad antioxidante en vegetales como el método quimioluminiscente que emplea el luminol y se basa en la medición del tiempo de inducción en la oxidación de un lípido expuesto a 2,2-azo-bis (2-aminodipropano) como fuente de radicales libres. Otro de los métodos emplea al radical DPPH (2,2 difenil-1-picril hidrazil), el cual por su estabilidad, es destruido solamente por antioxidantes y es empleado para evaluar la efectividad de antioxidantes, de tal manera que el mejor compuesto destructor del DPPH, será el mejor antioxidante.¹¹⁹⁻¹²³

a) Método de actividad frente al radical DPPH

❖ Fundamento

El DPPH es un radical libre estable cuando es disuelto en metanol o etanol, y aparece un color púrpura característico; cuando reacciona con la sustancia antioxidante dona un hidrógeno (es capturado el radical libre) y se produce una decoloración al color amarillo ligero o transparente, como se muestra en el gráfico N° 5. Es posible cuantificar las

capacidades captadoras de radicales libres que poseen distintas sustancias, mediante la determinación del grado de decoloración que dichos compuestos provocan a una solución metanólica de DPPH (Gráfico N° 5).^{54, 124-128}

Fuente: CIBN (Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición). Capacidad atrapadora de radicales libres. Primer Curso Nacional Teórico Práctico: Antioxidantes en Recursos Fitoterapéuticos. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2006.⁵⁴

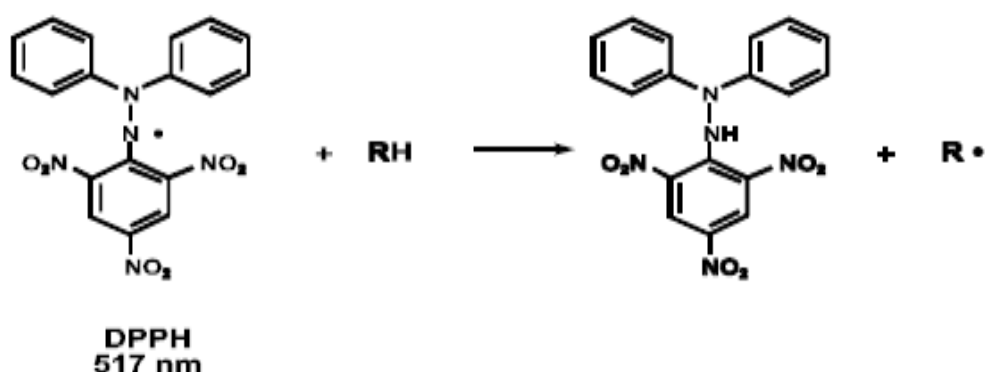


Gráfico N° 5. Mecanismo de reacción del DPPH con sustancias antioxidantes (RH)

Los resultados se pueden expresar como IC₅₀, % de captación, % de actividad antirradicalaria, o equivalentes a trolox (Gráfico N° 6) o equivalentes a vitamina C (cuando es comparado con estándares).⁵⁴

Fuente: Friaa, D. Kinetics of the reaction between the antioxidant Trolox (R) and the free radical DPPH in semi-aqueous solution. Org. Biomol. Chem. 2006

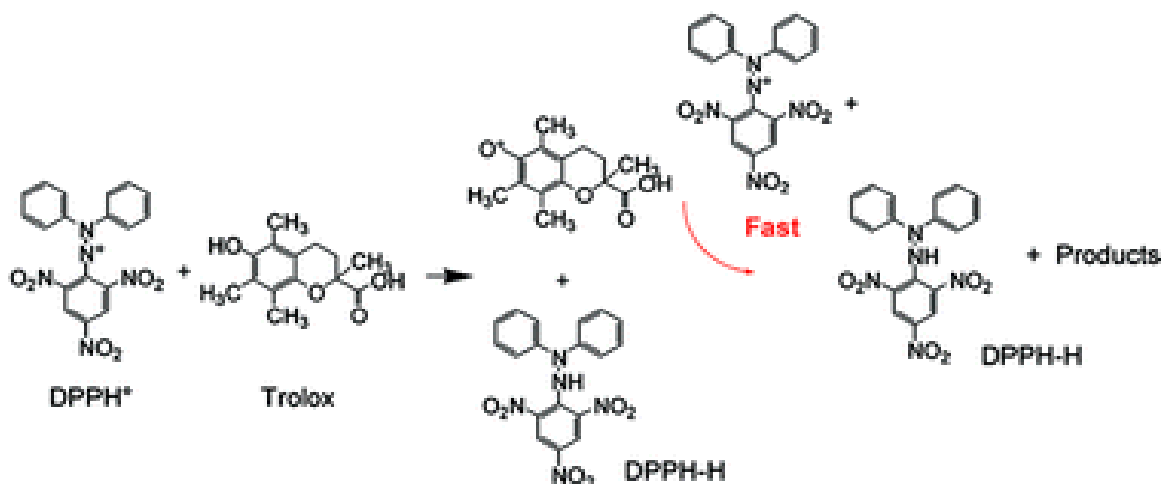


Gráfico N° 6. Mecanismo de reacción del radical DPPH con el estándar Trolox

❖ **Diseño experimental**

La actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de la corteza fue determinado usando el método 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).¹²⁷⁻¹²⁹ La inhibición de los radicales libres por el extracto hidroalcohólico desecado disuelto en agua desionizada pasteurizada ha sido evaluado en el espectrofotómetro SPECTROQUANT PHARO 300 MERCK a 517 nm, frente a la absorbancia del radical de DPPH. Para las medidas de absorbancia en el rango visible se utilizaron cubetas (1 cm x 1 cm x 4 cm) de plástico.

La concentración inicial del extracto en agua desionizada pasteurizada (100 µg/mL) permitió diluir a las concentraciones finales de 5, 10, 20 y 25 µg/mL, en agua desionizada pasteurizada. Luego, en una batería de 5 tubos se colocaron 0.4 mL de cada solución preparada del extracto, y mezclado con 0.8 mL de la solución con el radical DPPH (2 mg%). La batería de tubos con la reacción fue ocultada bajo oscuridad a temperatura ambiente por 30 minutos. Después se midió la absorbancia de cada tubo, a 517 nm.

El porcentaje de inhibición o porcentaje de decoloración fue calculado como:

$$\% \text{ inhibición} = A - B / A \times 100$$

Donde: **A:** Lectura de absorbancia del DPPH

B: Lectura de la muestra

La concentración requerida para el 50% de inhibición del radical libre DPPH (IC₅₀) fue calculada mediante la ecuación de la gráfica de concentración del extracto y trolox vs % inhibición.

El blanco para calibrar el equipo fue metanol: agua (2:1). Como control positivo se preparó una curva patrón de TROLOX (6-hidroxi-2, 5, 7, 8 tetrametilcromo-2 ácido carboxílico 97%) a las mismas condiciones de análisis del extracto hidroalcohólico, para comparar las IC₅₀. Asimismo, de los datos obtenidos para hallar el % de inhibición; se calculó el equivalente de trolox (mg/mL), utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{mg/ mL Trolox} = \frac{A - B}{A - C} \times \frac{\text{mg Trolox}}{\text{Vr MP}} \times \text{fd}$$

Donde: **A:** Lectura de absorbancia del DPPH
B: Lectura de absorbancia de la muestra
C: Lectura de absorbancia del Trolox
Vr MP: Volumen real de la muestra problema
Fd: Factor de dilución

❖ Análisis estadístico

Los resultados fueron procesados usando los programas Microsoft Excel 2003 (Windows Office) y MINITAB Statistical Software English (versión 15.00 para Windows XP). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados expresados como valores promedios ± desviación estándar.¹¹¹⁻¹¹³

En los ensayos de actividad antioxidante, se determinó el coeficiente de variación considerando como criterio c.v.f. < 5 %, y el coeficiente de correlación considerando como criterio R² > 0.990; de la relación % Inhibición/ Concentración de extracto.

3.2.8. Evaluación de la actividad antimicrobiana.

El método permite estimar el grado de inhibición del crecimiento de los microorganismos y sus cambios morfológicos de una manera simple. Existen dos métodos posibles para la incorporación del extracto hidroalcohólico: en un disco de papel o en un pozo hecho en medio de agar ¹²⁹

a) Método difusión en agar mediante discos.

❖ Definición

La técnica de difusión en agar mediante discos es el método usado con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos para medir la susceptibilidad de las bacterias a los distintos agentes antibióticos. Se colocan discos de papel impregnados con antibióticos en la superficie del agar, previamente inoculado con el microorganismo a probar. ¹³⁰

❖ Fundamento

El disco impregnado con el antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el agua es absorbida por el papel de filtro esterilizado y el antibiótico difunde al medio que lo rodea. El promedio de extracción del antibiótico del disco es mayor que su difusión hacia el medio, de modo que la concentración inmediatamente adyacente al disco puede exceder a la del disco mismo. Sin embargo a medida que aumenta la distancia del disco, se produce una reducción logarítmica de la concentración de antibiótico. ¹³⁰

Si la placa ha sido previamente inoculada con una suspensión bacteriana, se produce un crecimiento simultáneo de bacterias en la superficie del agar. Cuando se alcanza una masa de bacterias crítica, la actividad inhibidora del antibiótico es superada y se produce el crecimiento bacteriano. El tiempo (tiempo crítico) necesario para alcanzar la masa celular crítica (4 a 10 horas en las bacterias estudiadas habitualmente) es característico para cada

especie, pero es influido por la composición del medio y la temperatura de incubación. La amplitud lateral de la difusión antimicrobiana antes que se alcance; el tiempo crítico se afecta por la profundidad del agar, porque la difusión ocurre en tres dimensiones. El punto en el cual se alcanza la masa celular crítica, aparece como un círculo marginado bien marcado de crecimiento bacteriano, con el centro del disco formando el centro del círculo si la prueba ha sido realizada correctamente. La concentración de antibiótico difundido en esta interfase de crecimiento y las bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) obtenida en las pruebas de dilución. Aunque en la práctica no se hace el cálculo directo de la concentración inhibidora, la CMI puede calcularse con razonable exactitud si se conocen las características de la difusión antimicrobiana y el crecimiento bacteriano.¹³⁰

❖ Obtención de cepas

Los microorganismos se seleccionaron teniendo en cuenta su facilidad de desarrollo en medios de cultivo convencionales y su empleo en ensayos de susceptibilidad a antibióticos.

131

Las cepas utilizadas en el ensayo de actividad antimicrobiana están depositadas en el American Type Culture Collection (ATCC), son de referencia internacional y forman parte de una batería mínima de cepas que se emplean para este tipo de estudio y se relacionan: *Staphylococcus aureus* (ATCC 15008), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14207) y *Candida albicans* (ATCC 10231).

❖ Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados son medios ricos que permiten el crecimiento del microorganismo sin dificultad. Para las bacterias se utilizó medio Agar TSA y para levadura, medio Sabouraud, esterilizados en autoclave a 121° C y 15 libras de presión durante 15 minutos.

❖ Controles

Como control negativo se utilizó agua desionizada pasteurizada. En el caso de los controles positivos se empleo estreptomicina (30 µg/disco) para las bacterias, y nistatina (20 µg/disco) para levaduras.

❖ Diseño experimental

La actividad antimicrobiana se determinó por el método de difusión en agar con discos, descrita por Rotman y col. (2003).¹³²

Los discos esterilizados de papel WHATMAN® (6 mm de diámetro) se sumergieron, con una capacidad de 20 µL de las concentraciones de 15%, 20% y 30% de extracto hidroalcohólico desecado disuelto en agua desionizada pasteurizada; se colocaron sobre el agar solidificado el cual tenía previamente inoculados los microorganismos examinados, de tal forma que no se superponen a la zona de inhibición. Como control negativo es usado agua desionizada pasteurizada y como control positivo es usado la estreptomicina (30 µg/ disco) y nistatina (20 µg/ disco) para bacterias y hongos, respectivamente para comparar la sensibilidad del aislamiento de los microorganismos examinados. Se mantuvieron las placas a temperatura ambiente durante media hora para la difusión de la muestra en el medio de agar. Luego, las placas fueron incubadas en estufa a 37° C, por 24 horas para las bacterias y 48 horas para levaduras. La actividad antimicrobiana fue evaluada por la diferencia de la

medida del halo de inhibición en milímetros con el diámetro del disco de 6 mm, para el análisis de microorganismos y comparada con los controles. Para demostrar repetibilidad, se realizó el análisis por triplicado realizando la medida de los halos y considerando la media de los resultados.¹³³

El diámetro de cada halo de inhibición se midió usando una regla milimetrada (+/- 0,5 mm). Siendo estas registradas mediante una cámara digital Lumix a 8.2 Megapixels.

El cálculo del porcentaje del efecto inhibitorio relativo respecto al control positivo, fue realizado de la siguiente manera:¹³⁴

% efecto de inhibición =	Promedio de diámetros de halos de inhibición del extracto.	x 100
	Promedio de diámetros de halos de inhibición del control positivo	

❖ Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado y el análisis de varianza (ANOVA) mediante el software Microsoft Excel 2003 (Windows Office) y MINITAB Statistical Software English (versión 15.00 para Windows XP)¹¹¹⁻¹¹³

Los datos se presentan como valores promedios \pm desviación estándar de las determinaciones por triplicado.

IV. RESULTADOS

4.1. Del análisis histoquímico

En el estudio micromorfológico se visualizó en el corte transversal de la corteza: parénquima cortical, parénquima medular, xilema, floema, colénquima y epidermis.¹³⁵

En el floema se observó una coloración rojiza, debido a la reacción de vainillina con las células que almacenan taninos, demostrando la presencia de proantocianidinas, señaladas por flechas celestes en la **Foto N° 6**

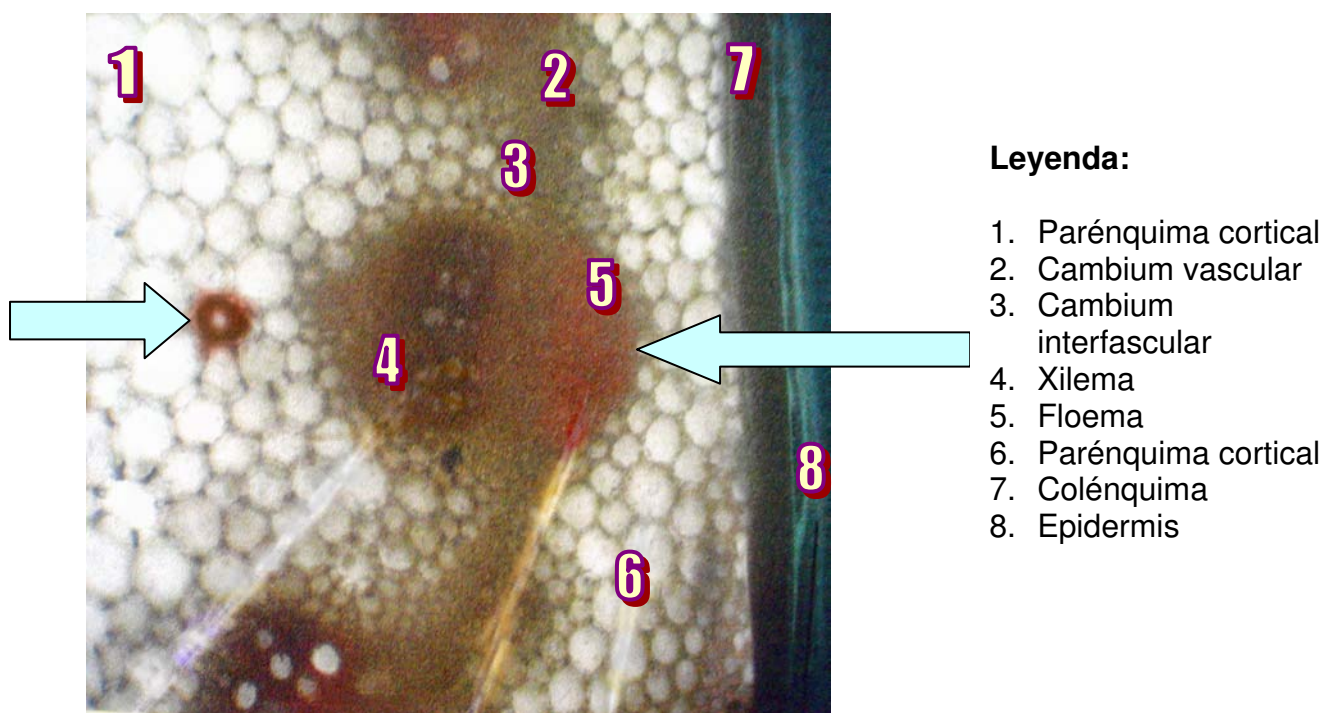


Foto N° 6. Corte transversal de la corteza de *Triplaris americana* L. frente al reactivo vainillina-HCl

4.2. Del estudio farmacognóstico

4.2.1. Del análisis preliminar

❖ Del ensayo organoléptico

Tabla N° 4. Características organolépticas del extracto hidroalcohólico desecado.

CARACTERÍSTICA	RESULTADO
ASPECTO	Cristales pulverizados
COLOR	Rojo brillante
OLOR	Sui generis
SABOR	Amargo, astringente

❖ Del ensayo biológico

- **Índice hemolítico:** Después de 24 horas no se observa halos de hemólisis.

❖ Del ensayo físico

- **Índice afrosimétrico:** No se observó espuma persistente por más de 30 minutos.
- **Determinación de pH:** pH 4.
- **Marcha de solubilidades:** De acuerdo a la Tabla N° 5.

Tabla N° 5. Solubilidades del extracto hidroalcohólico desecado.

SOLVENTES	RESULTADOS
Éter etílico	-
N-hexano	-
Tolueno	-
Cloroformo	+
Acetato de etilo	-
Dietilamina	-
Butanol	-
Propanol	++
Etanol	++
Metanol	+++
Ácido acético	-
Agua desionizada	++

(-) Insoluble (+) Poco soluble (++) Soluble (+++) Muy soluble

4.2.2. Del screening farmacognóstico

Tabla N° 6. Resultados del screening farmacognóstico del extracto hidroalcohólico desecado.

CONSTITUYENTES QUÍMICOS	ENSAYO	REACCIÓN	REALIZADO EN: *
Carbohidratos	R. Molish	+++	Extracto
Azúcares reductores	R. Fehling	++	Extracto
Heterósidos	R. Vainillina sulfúrico	+++	Extracto
Aminoácidos libres y amino grupos	R. Ninhidrina	-	-
Vitamina B1 (Tiamina)	R. HgCl ₂	-	-
Vitamina C	R. Yodo	-	-
	R. Nitroprusiato de sodio	-	-
Flavonoides	R. Shinoda	++	Extracto, fracción C, D. *
Esteroides y triterpenoides	R. Liebermann Burchard	-	-
Cardenólidos	R. Baljet	-	-
Cardiotónicos	R. Legal	-	-
Alcaloides	R. Dragendorff	-	-
	R. Mayer	-	-
Antraquinonas	R. Borntranger	-	-

* En el Esquema N° 2 (página 41), se presenta la ubicación del análisis realizado en el screening farmacognóstico.

Leyenda

+++ Abundante
 ++ Moderado
 + Leve
 (-) Ausencia

Tabla N° 7. Resultados de la determinación de compuestos fenólicos y taninos del extracto hidroalcohólico desecado.

CONSTITUYENTES QUÍMICOS	ENSAYO	REACCIÓN	REALIZADO EN: *
Fenólicos	FeCl ₃ 5 %	+++	Extracto, fracción D *
Taninos	R. Gelatina	+++	Extracto, fracción C, D. *
	Bicromato de potasio 5 %	+++	Extracto
	Acetato de plomo 5 %	+++	Extracto
	Formol clorhídrico	+++	Extracto
	Agua de bromo saturado	+++	Extracto
	Alcaloide atropina	+++	Extracto
	Piel de venza	+++	Extracto
	Prueba de catequina	+++	Extracto
	Acetato de zinc	+++	Extracto
	Ferrocianuro de potasio y amoníaco	+++	Extracto
	Amoníaco	+++	Extracto

* En el Esquema N° 2 (página 41), se presenta la ubicación del análisis realizado en el screening farmacognóstico.

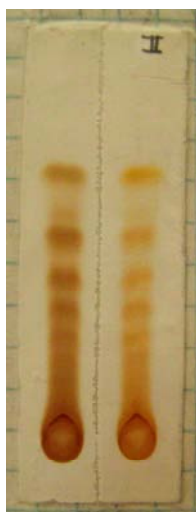
Leyenda

+++ Abundante
++ Moderado
+ Leve
(-) Ausencia

4.2.3. Del análisis cromatográfico

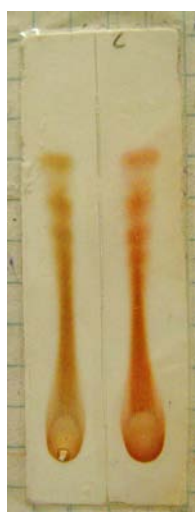
Con respecto al análisis cromatográfico efectuado al extracto hidroalcohólico desecado, es necesario señalar que esta reacción es positiva frente al revelador potasa alcohólica 5%. El extracto mostró a simple vista 7 manchas, en el cromatograma N° 1 (Foto N° 7); y se hallaron los valores de R_f para las manchas del cromatograma, en la Tabla N° 8.

Cromatograma 1



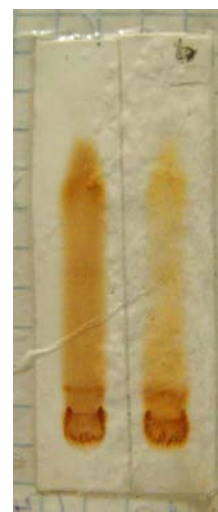
Soporte: Cromatofolio con silicagel GF 254
SS: Acet. etilo: MeOH: H₂O (100: 13.5: 10)
Rev: KOH 5%

Cromatograma 2



Soporte: Cromatofolio con silicagel GF 254
SS: Acet. etilo: MeOH: H₂O (77: 15: 8)
Rev: Vainillín sulfúrico

Cromatograma 3



Soporte: Cromatofolio con silicagel GF 254
SS: Butanol: Ácido acético: H₂O (4: 1: 5) fase superior
Rev: AlCl₃ 1%

Foto N° 7. Cromatogramas del extracto hidroalcohólico desecado.

Tabla N° 8. Resultado de R_f para cromatografía en capa fina del extracto hidroalcohólico desecado. (Cromatograma N° 1).

	R _f 1	R _f 2	R _f 3	R _f 4	R _f 5	R _f 6	R _f 7
Extracto hidroalcohólico	0.23	0.30	0.36	0.45	0.55	0.60	0.72
Color de mancha	Anaranjado					Amarillo	Anaranjado

4.2.4. Del análisis de proantocianidinas

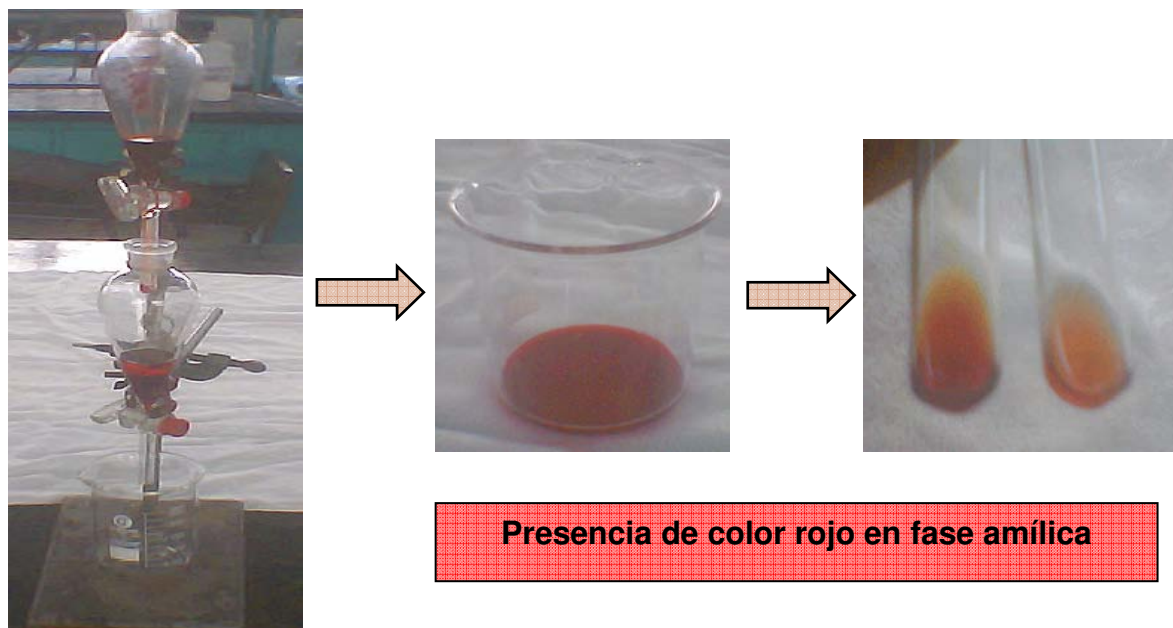


Foto N° 8. Caracterización y separación de antocianidinas.

4.2.5. Del análisis UV-visible e Infrarrojo

a) De la espectroscopía UV-visible

Tabla N° 9. Determinación de grupos funcionales del extracto hidroalcohólico desecado, por el método de Espectroscopía UV-visible.^{90, 141}

λ^{MeOH} (nm)	Grupos funcionales
222.03	Compuestos aromáticos (Banda E)
222.03, 223.98, 226.03, 228.02, 230.04, 231.94, 235.5, 241.5	Compuestos aromáticos (Banda K)
260.5, 277.09, 283.0	Compuestos aromáticos (Banda B)
277.09, 283.0, 293.5, 311.5, 328.0	Compuestos aromáticos (Banda R)
277.09	Grupo cetónico (C=O)

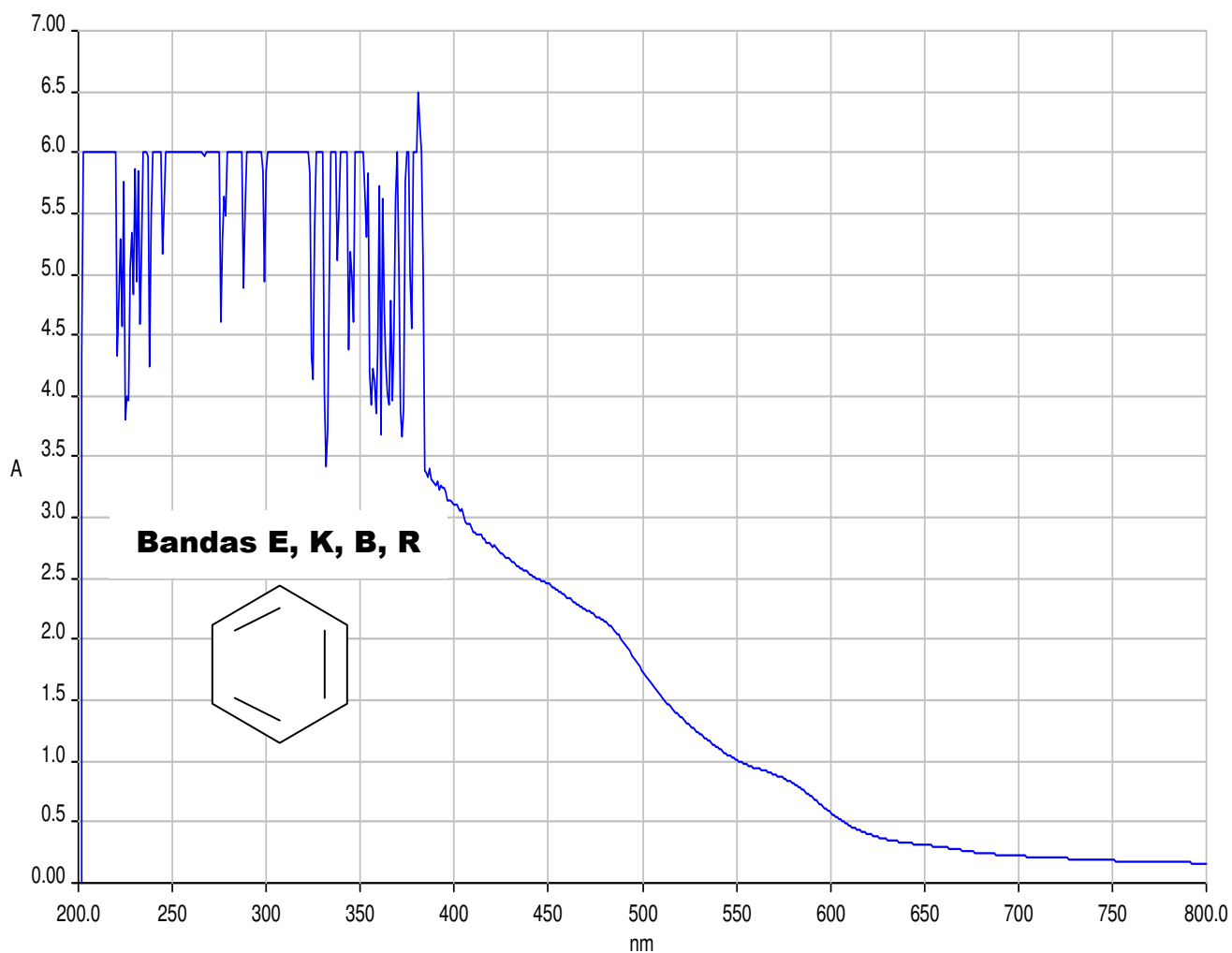


Gráfico N° 7. Espectroscopía UV-visible del extracto hidroalcohólico desecado.

Tabla N° 10. Determinación de grupos funcionales del aislado amílico del hidrolizado del extracto hidroalcohólico desecado, por el método de Espectroscopía UV-visible.

$\Lambda^{\text{AmilicoOH}}$ (nm)	Grupos funcionales
206.02, 209.05, 212.07, 215.29, 218.94	Compuestos aromáticos (Banda E)
221.07, 223.95, 228.27, 233.85, 236.04, 238.06, 241.95	Compuestos aromáticos (Banda K)
255.93, 258.11, 264.56, 267.07, 270.07, 277.0, 284.97, 286.87, 289.12	Compuestos aromáticos (Banda B)
277.0, 284.97, 286.87, 289.12, 290.95, 292.99, 296.51, 301.03, 306.8, 310.03, 311.99, 316.84, 325.5	Compuestos aromáticos (Banda R)
277.0	Grupo cetónico (C=O)
270.0, 286.87	Fenol

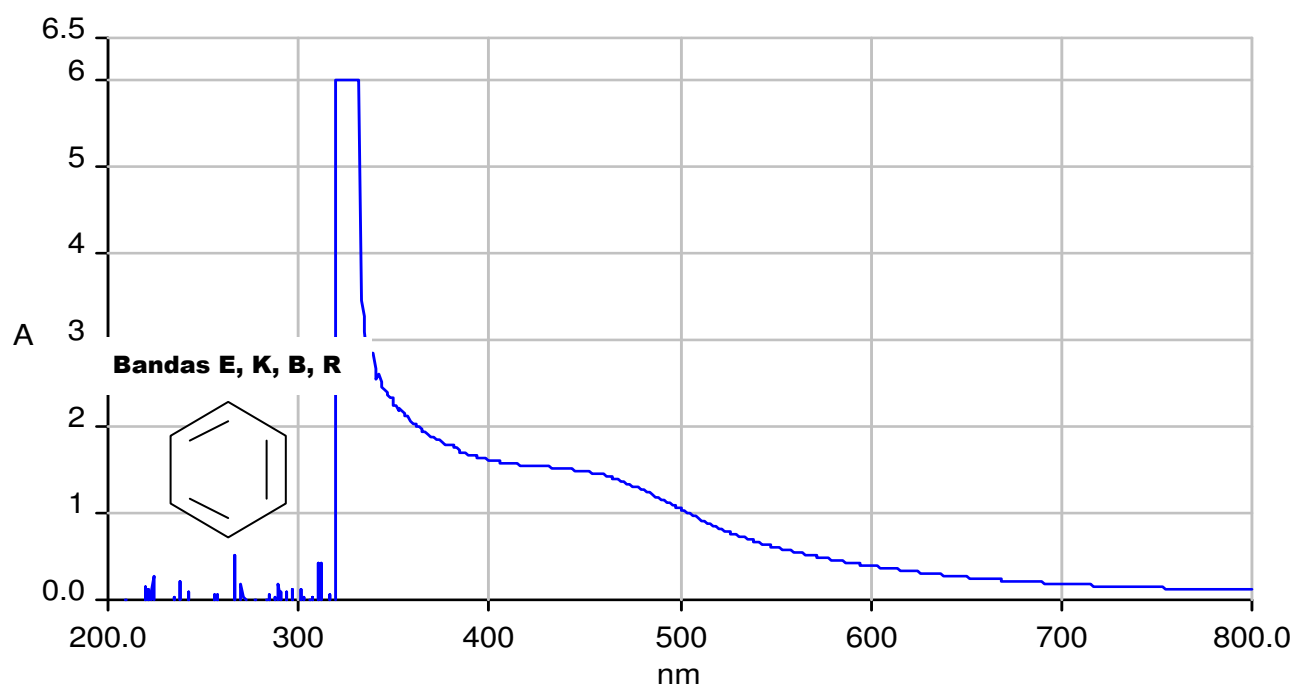


Gráfico N° 8. Espectroscopía UV-visible del aislado amílico del hidrolizado del extracto hidroalcohólico desecado.

b) De la espectroscopía Infrarroja (IR).

El análisis espectrofotométrico mediante el método de FT-IR, mostró picos de transmitancia en longitudes de onda para los grupos hidroxilos (-OH), doble enlace del anillo aromático (C=C). ^{90, 136-140}

Tabla N° 11. Determinación de grupos funcionales del extracto hidroalcohólico desecado por el método de Espectroscopía Infrarrojo.

Vibración (cm⁻¹)	Grupos funcionales
3356.76	Tensión O-H (-OH) asociado
1611.82	Tensión de doble enlace C-C del anillo aromático (C=C)
1520.17	Tensión C-H de anillo aromático
1444.95	Flexión C-H (deformación de tijera del metileno) (-CH ₂ -)
1368.78	Flexión C-H (deformación de aleteo del metileno) (-CH ₂ -)
1281.72	Flexión de C-O para fenoles
1108.51	Flexión C-H del anillo aromático
774.02	Flexión C-H del anillo aromático (deformación fuera de plano)

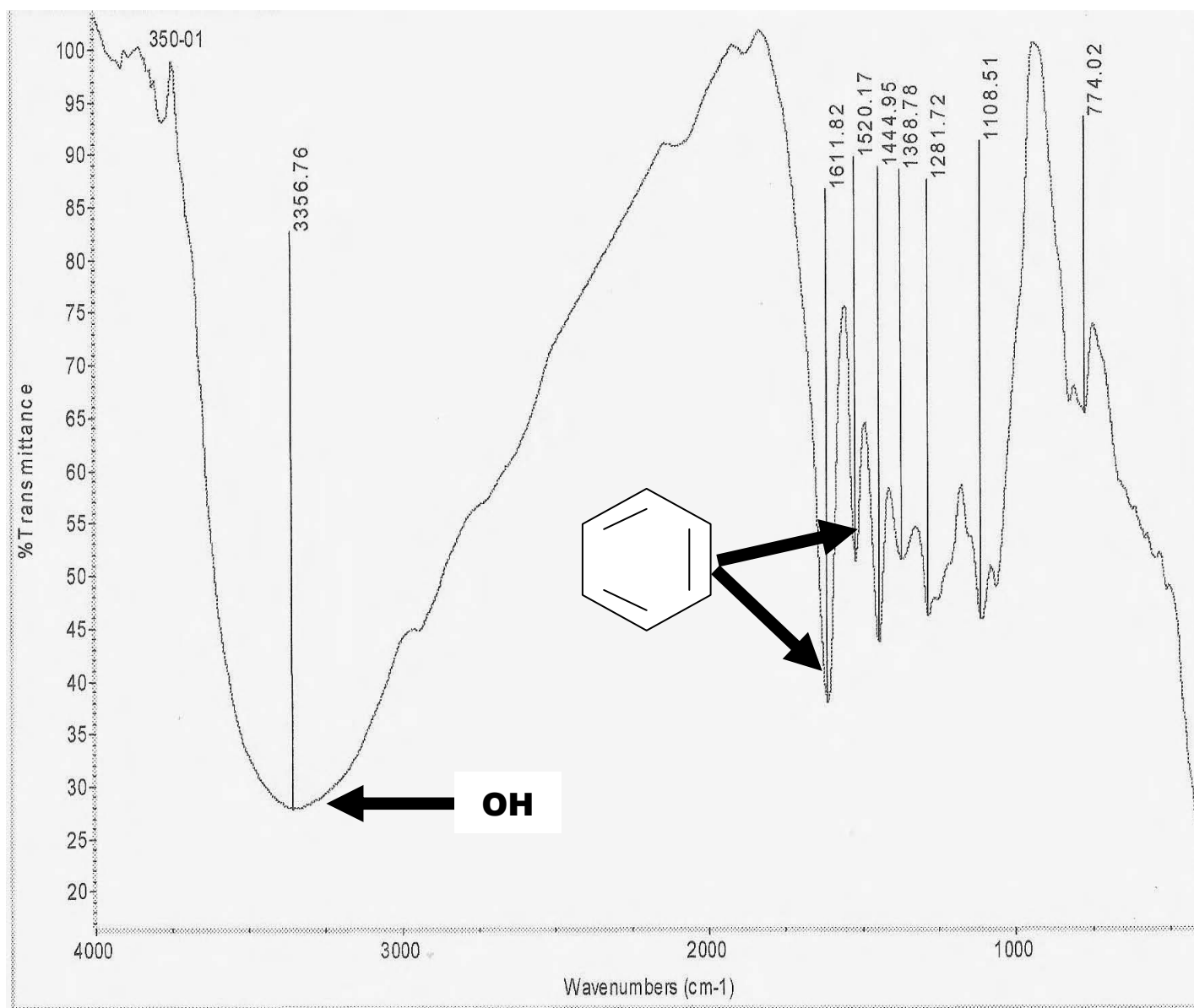


Gráfico N° 9. Espectroscopía Infrarrojo con transformada de Fourier del extracto hidroalcohólico desecado.

Tabla N° 12. Determinación de grupos funcionales del aislado amílico del hidrolizado del extracto hidroalcohólico desecado, por el método de Espectroscopía Infrarrojo con transformada de Fourier.

Vibración (cm ⁻¹)	Grupos funcionales
3350.67	Tensión O-H (-OH) asociado
1613.43	Tensión de doble enlace C-C del anillo aromático (C=C)
1520.43	Tensión C-H de anillo aromático
1446.35	Flexión C-H (deformación de tijera del metileno) (-CH ₂ -)
1281.70	Flexión de C-O para fenoles
1112.58	Flexión C-H del anillo aromático
775.34	Flexión C-H del anillo aromático (deformación fuera de plano)

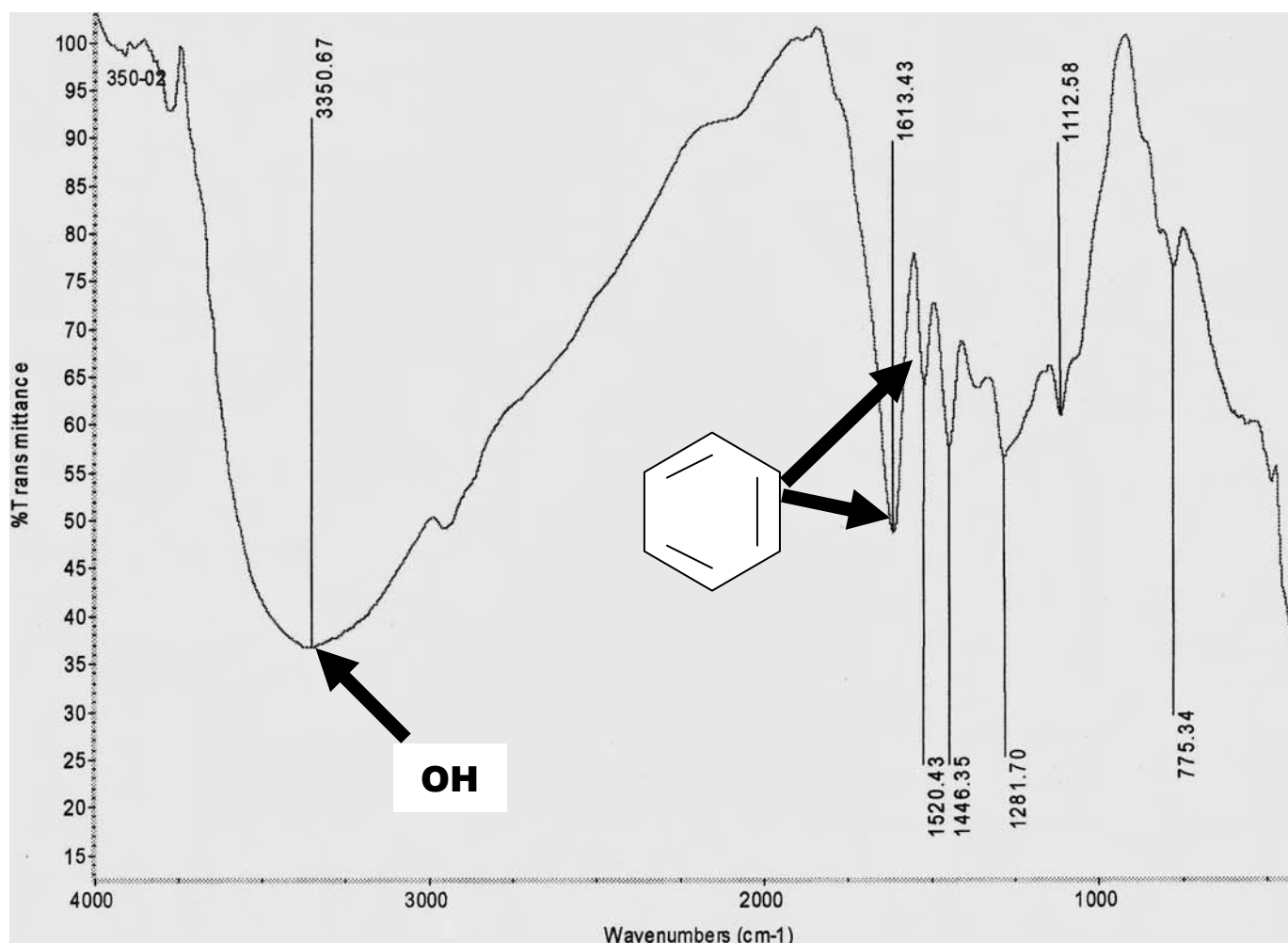


Gráfico N° 10. Espectroscopía Infrarrojo con transformada de Fourier del aislado amílico del hidrolizado del extracto hidroalcohólico desecado.

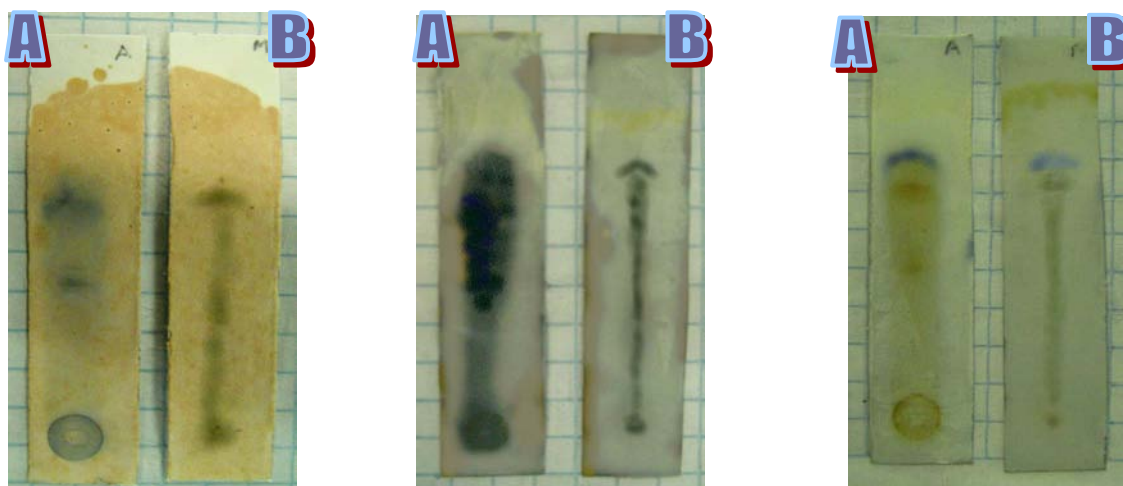
4.2.6. De la cuantificación de compuestos fenólicos

Se obtuvieron 13.5158 ± 0.1825 g de ácido tánico/ 100 g de corteza para compuestos fenólicos totales; y 11.8590 ± 0.5453 g de ácido tánico/ 100 g de corteza para taninos.

❖ De la especificidad

El resultado del cromatograma realizado al extracto hidroalcohólico desecado, en silicagel GF₂₅₄, empleando como fase móvil el sistema acetato de etilo: metanol: agua (100: 13.5: 10) y revelando con los agentes reveladores señalados puede observarse en la Foto N° 9, donde se observa que los R_f obtenidos con los diferentes reveladores coinciden, exceptuando la mancha amplia oscura que sólo aparece con el reactivo de Folin.

En el caso de ambos secuestros (ácido tánico y extracto hidroalcohólico), se obtuvo leve coloración para el ácido tánico mas no para el extracto, con los reactivos empleados; mostrados en la Foto N° 10.



Soporte: Cromatofolio con silicagel GF₂₅₄
SS: Acetato de etilo: metanol: agua (100: 13.5: 10)
Revelador: FeCl₃ 5%

Soporte: Cromatofolio con silicagel GF₂₅₄
SS: Acetato de etilo: metanol: agua (100: 13.5: 10)
Revelador: Folin

Soporte: Cromatofolios con silicagel GF₂₅₄
SS: Acetato de etilo: metanol: agua (100: 13.5: 10)
Revelador: Ácido fosfomolibdico 5%

Foto N° 9. Cromatogramas obtenidos para el extracto hidroalcohólico (B) y el ácido tánico (A).

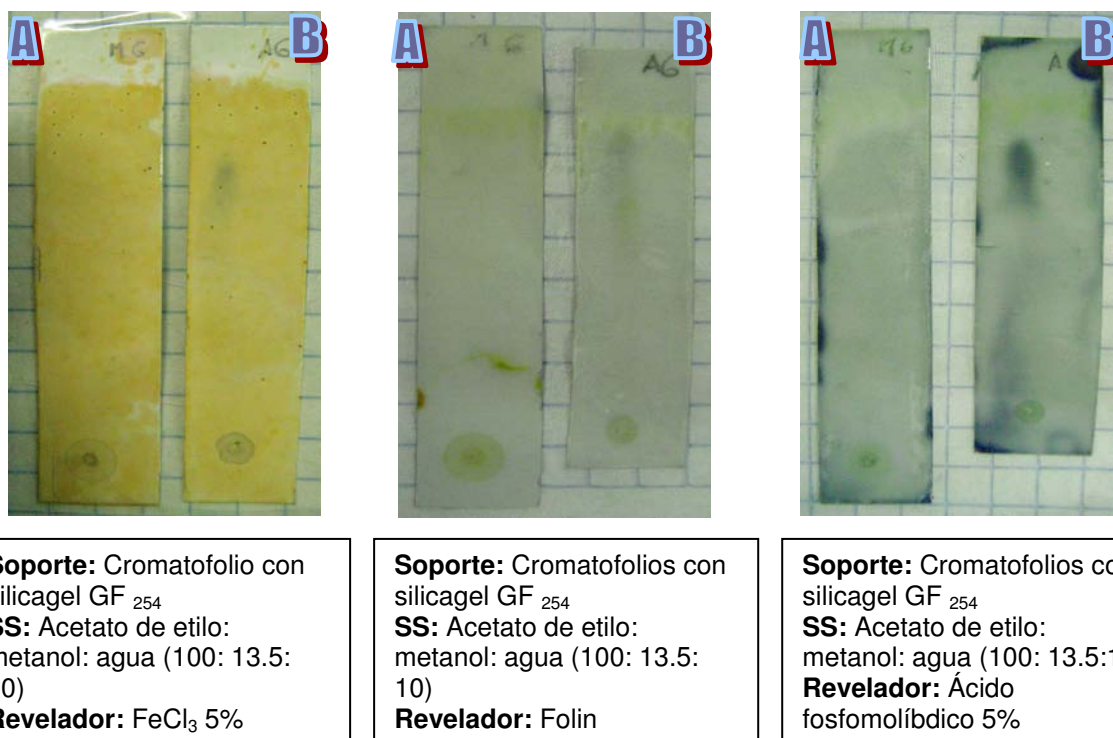


Foto N° 10. Cromatogramas obtenidos para el extracto hidroalcohólico y ácido tánico, después de la reacción con el reactivo gelatina.

❖ De la linealidad

La curva de calibración del ácido tánico en el rango de concentraciones estudiadas responde a la ecuación $y = 0.0432 x + 0.0163$ y a un coeficiente de correlación igual a 0,9993. Al realizar la significación estadística de la varianza de la pendiente se rechazó la hipótesis $H_0: (b=0)$ y el cero quedó incluido en el intervalo de confianza del término independiente. Los factores respuestas fueron similares entre sí y cercanos al valor de la pendiente y su coeficiente de variación fue de 4.67 % (Tabla N° 13).

Tabla N° 13. Test de linealidad para el ácido tánico.

X (ppm)	Y (Abs)	F (Y/X)	Desviación estándar: 0.0021 Promedio: 0.0459 Coeficiente de correlación: 0.9993 Ecuación de recta: $y = 0.0432x + 0.0163$ C.V.F. = 4.67 % Criterio c.v.f. < 5%
1	0.050	0.0500	
2	0.097	0.0485	
4	0.182	0.0455	
6	0.278	0.0463	
8	0.383	0.0479	
10	0.464	0.0464	
12	0.533	0.0444	
14	0.617	0.0441	
16	0.702	0.0439	
18	0.798	0.0443	
20	0.870	0.0435	

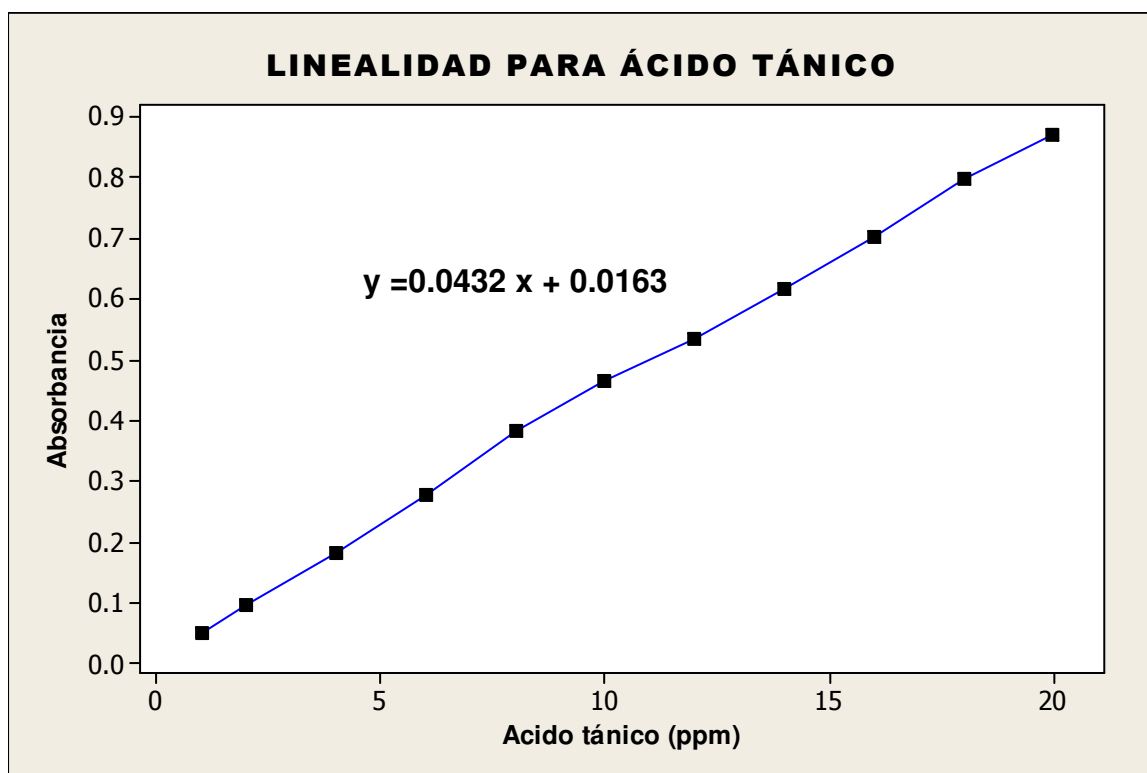


Gráfico N° 11. Linealidad para el ácido tánico.

La curva de calibración para la etapa A en el rango de concentraciones estudiadas responde a la ecuación $y = 0,1254 x + 0,019$ y a un coeficiente de correlación igual a 0,9994. Al realizar la significación estadística de la varianza de la pendiente se rechazó la hipótesis $H_0: (b = 0)$ y el cero quedó incluido en el intervalo de confianza del término independiente.

Los factores respuestas fueron similares entre sí y cercanos al valor de la pendiente y su coeficiente de variación fue de 4.29 % (Tabla Nº 14).

Tabla Nº 14. Test de linealidad para el extracto, etapa A.

X (mL)	Y (Abs)	F (Y/X)	Desviación estándar: 0.0058
1	0.143	0.143	Promedio: 0.1339
2	0.270	0.135	Coeficiente de correlación: 0.9994
3	0.392	0.131	Ecuación de recta: $y = 0.1254 x + 0.019$
4	0.532	0.133	C.V.F. = 4.29 %
5	0.639	0.128	Criterio c.v.f. < 5%

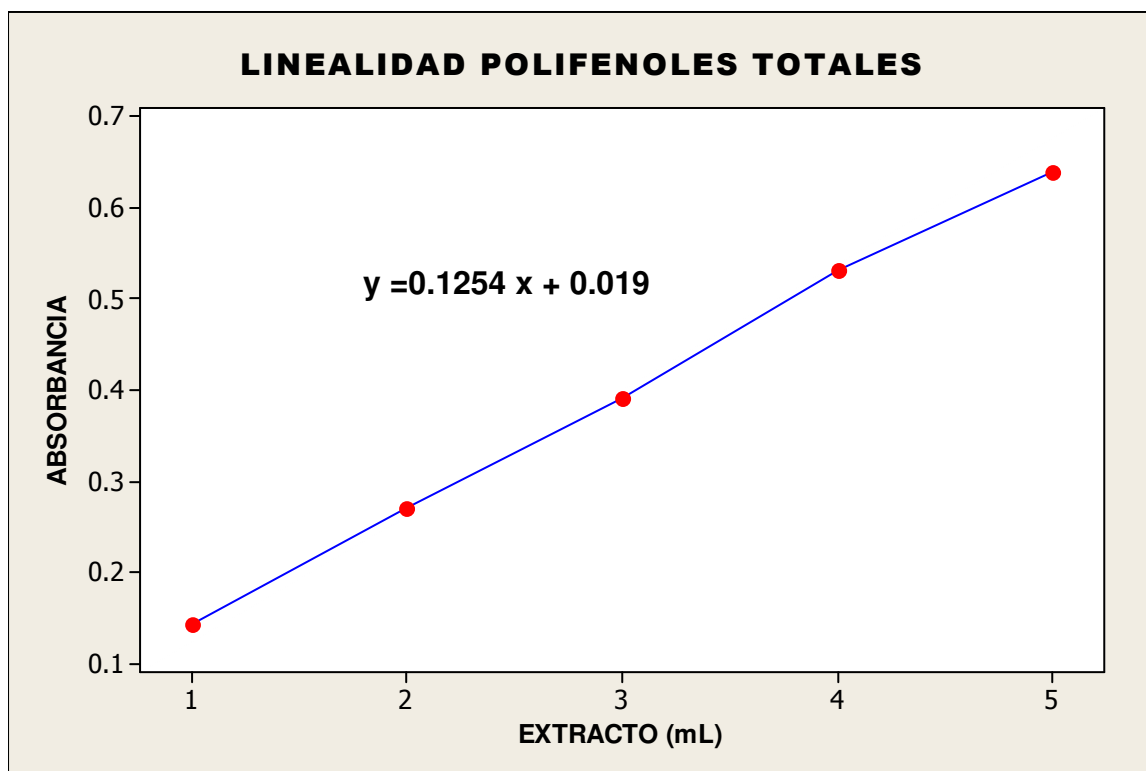


Gráfico N° 12. Linealidad para Método A (Polifenoles totales)

La curva de calibración para la etapa B en el rango de concentraciones estudiadas responde a la ecuación $y = 0,0222 x + 0,0014$ y a un coeficiente de correlación igual a 0,9950. Al realizar la significación estadística de la varianza de la pendiente se rechazó la hipótesis $H_0: (b = 0)$ y el cero quedó incluido en el intervalo de confianza del término independiente.

Los factores respuestas fueron similares entre sí y cercanos al valor de la pendiente y su coeficiente de variación fue de 4.77 % (Tabla N° 15).

Tabla Nº 15. Test de linealidad para el extracto, etapa B.

X (mL)	Y (Abs)	F (Y/X)	Desviación estándar: 0.0011
1	0.024	0.024	Promedio: 0.0228
2	0.044	0.022	Coeficiente de correlación: 0.995
3	0.067	0.022	Ecuación de recta: $y = 0.0222x + 0.0014$
4	0.096	0.024	C.V.F. = 4.77 %
5	0.109	0.022	Criterio c.v.f. < 5%

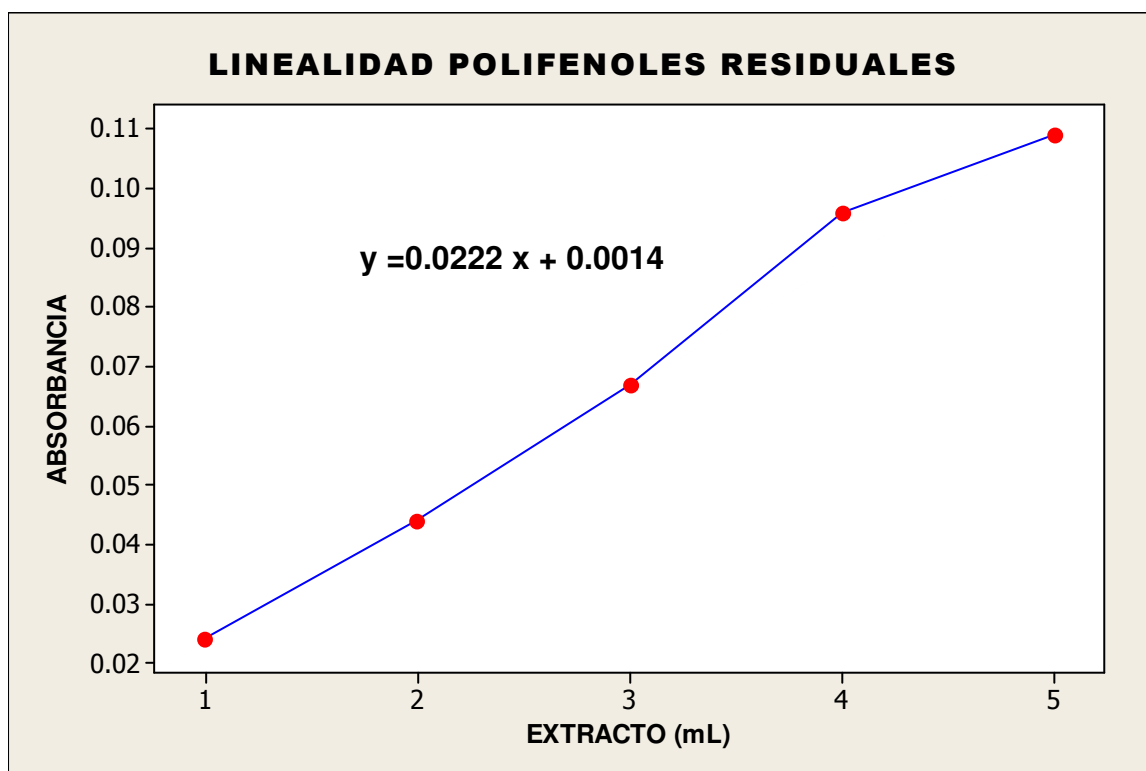


Gráfico Nº 13. Linealidad para Método B (Polifenoles residuales).

❖ De la precisión

El coeficiente de variación de las 15 réplicas de ensayo para el estudio de repetibilidad fue de 2.48 % (Tabla Nº 16) y 1.52 % (Tabla Nº 17) en el caso de la reproducibilidad; realizándose en este último los tests de *Fisher* y *Student* de los cuales se obtuvieron los valores 0.55 y 1.81 respectivamente.

Tabla Nº 16. Estudio de repetibilidad.

Número de réplica	% Taninos (T/C)*	Número de réplica	% Taninos
1	53.289	9	54.736
2	54.012	10	56.665
3	51.842	11	55.218
4	54.977	12	53.530
5	56.665	13	53.771
6	53.771	14	53.289
7	52.566	15	54.253
8	54.977		
Número de réplicas: n = 15			
Promedio de réplicas: 54.2374			
Desviación estándar de réplicas: 1.3471			
Coeficiente de variación: 2.48 %			
Criterio c.v. < 3 %			

* g ácido tánico/ 100 g extracto seco tal cual (T/C)

Tabla N° 17. Estudio de reproducibilidad.

DÍA	% TANINOS (T/C)*		Número de réplicas: 6 por analista Desviación estándar: 0.8297 Promedio: 54.4343 C.V.F. = 1.52 % Criterio c.v.f. < 5%
	Analista Nº 1	Analista Nº 2	
1	53.2890	53.2890	
	55.9414	53.7712	
	54.4946	54.7357	
2	55.4591	54.0123	
	54.2535	55.2180	
	54.0123	54.7357	
Prueba t de Student: $0.55 < 1.81$ (t calculada < t tabulada) (GL = 10; p = 0.05) H₀ aceptada: No existen diferencias estadísticas significativas			
Prueba F de Fisher: $1.81 < 5.05$ (F calculada < F tabulada)(GL = 5/5; p = 0.05) H₀ aceptada: No existen diferencias estadísticas significativas			

* g ácido tánico/ 100 g extracto tal cual (T/C)

❖ De la exactitud

De los resultados de recuperación en por ciento se obtuvo una "t" de *Student* igual a 1.72. Al aplicar la prueba de *Cochran* el valor de la "G" experimental resultó 0.14 (Tabla N° 18).

Tabla N° 18. Estudio de exactitud por el método de adición de patrón.

Concentración (ppm)	% de recuperación			Varianza
2	107.6389	100.9259	97.9938	0.4465
2.5	108.7963	101.8519	99.5370	6.0014
3	107.6389	97.2222	101.0802	2.3815
% Recuperación media (n = 9): 102.5206				8.8294
Prueba t de Student: $1.72 < 1.86$ (t calculada < t tabulada) (GL = 8; p = 0.05) H₀ aceptada: No existen diferencias estadísticas significativas				
Prueba Q de Cochran: $0.14 < 0.87$ (t calculada < t tabulada) (k=3; n=3; p = 0.05) H₀ aceptada: No existen diferencias estadísticas significativas				

Tabla N° 19. Fenoles totales, fracción de polifenoles que precipitan proteínas y taninos condensados de corteza de *Triplaris americana* L.

DETERMINACIÓN	CORTEZA DE TANGARANA COLORADA
Fenoles Totales (g ácido tánico/100 g corteza) (700 nm)	13.5158 ± 0.1825
Fracción de polifenoles que precipitan proteínas (taninos: g ácido tánico/100 g corteza) (700 nm)	11.8590 ± 0.5453
Taninos condensados (Método de la proantocianidina. (550 nm)	1.62368 ± 0.0784

4.3. De la toxicidad aguda a dosis límite

La administración de una dosis límite de 2000 mg/ kg de masa corporal no provocó muertes de los animales o síntomas indicativos de toxicidad. La masa corporal como indicador de toxicidad, se comportó dentro de los parámetros establecidos para la curva de crecimiento de la especie y línea del modelo biológico utilizado (**Tablas N° 20 y N° 21**).

Tabla N° 20. Evolución de la masa corporal de los animales, en función del tiempo.

Tratamiento	Grupo experimental	Masa corporal (g/ rata)			
		Día 1	Día 7	Día 14	Diferencia
		☒1	☒7	☒14	☒14 – ☒1
Extracto hidroalcohólico	Ratas machos	194.6	216.4	235.4	40.8
	Ratas hembras	191.8	206.0	226.8	35.0
Control (agua)	Ratas machos	195.2	212.2	238.4	43.2
	Ratas hembras	189.8	209.0	230.4	40.6

Tabla N° 21. Rango de masa corporal con relación a la edad en semanas de la especie y línea del modelo biológico.

Edad (semanas)	Masa corporal (g/ rata)
7-8	180-200
8-9	200-220
9-10	220-240

4.4. De la actividad antioxidante

Tabla N° 22. Porcentaje de inhibición, de la reacción del Trolox con el DPPH.

CONC. μg/ mL	PROMEDIO ABS. TROLOX	ABS. DPPH – ABS. TROLOX	% INHIBICIÓN	F (% INHIB/ CONC)
5.0	0.5030	0.0650	11.4437	2.2887
10.0	0.4387	0.1293	22.7699	2.2770
15.0	0.3717	0.1963	34.5657	2.3044
20.0	0.2853	0.2827	49.7653	2.4883
25.0	0.2177	0.3503	61.6784	2.4671
c.v.f.= 4.3768 Criterio c.v.f. < 5 %				
Lectura de Abs. DPPH: 0.568			IC ₅₀ = 20.47 μg/ mL	

Tabla N° 23. Porcentaje de inhibición, de la reacción del extracto hidroalcohólico desecado, con el DPPH.

CONC. μg/ mL	PROMEDIO ABSORBANCIA	ABS. DPPH – ABS. EXTRACTO	% INHIBICIÓN	F (% INHIB/CONC)
5.0	0.5020	0.0660	11.6197	2.3239
10.0	0.4243	0.1437	25.2934	2.5293
15.0	0.3540	0.2140	37.6761	2.5117
20.0	0.2753	0.2927	51.5258	2.5763
25.0	0.2030	0.3650	64.2606	2.5704
c.v.f.= 4.1312 Criterio c.v.f. < 5 %				
Lectura de Abs. DPPH: 0.568			IC ₅₀ = 19.53 μg/ mL	

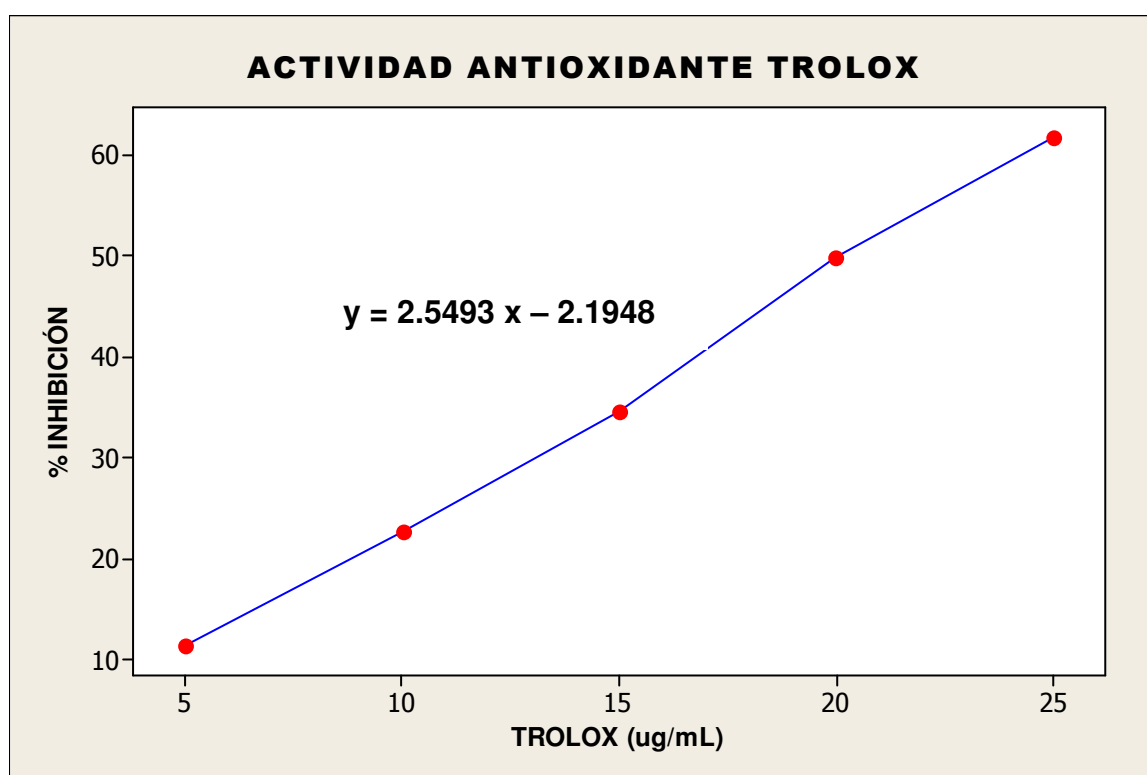


Gráfico N° 14. Curva patrón del Trolox expresado en μg/mL versus % inhibición.

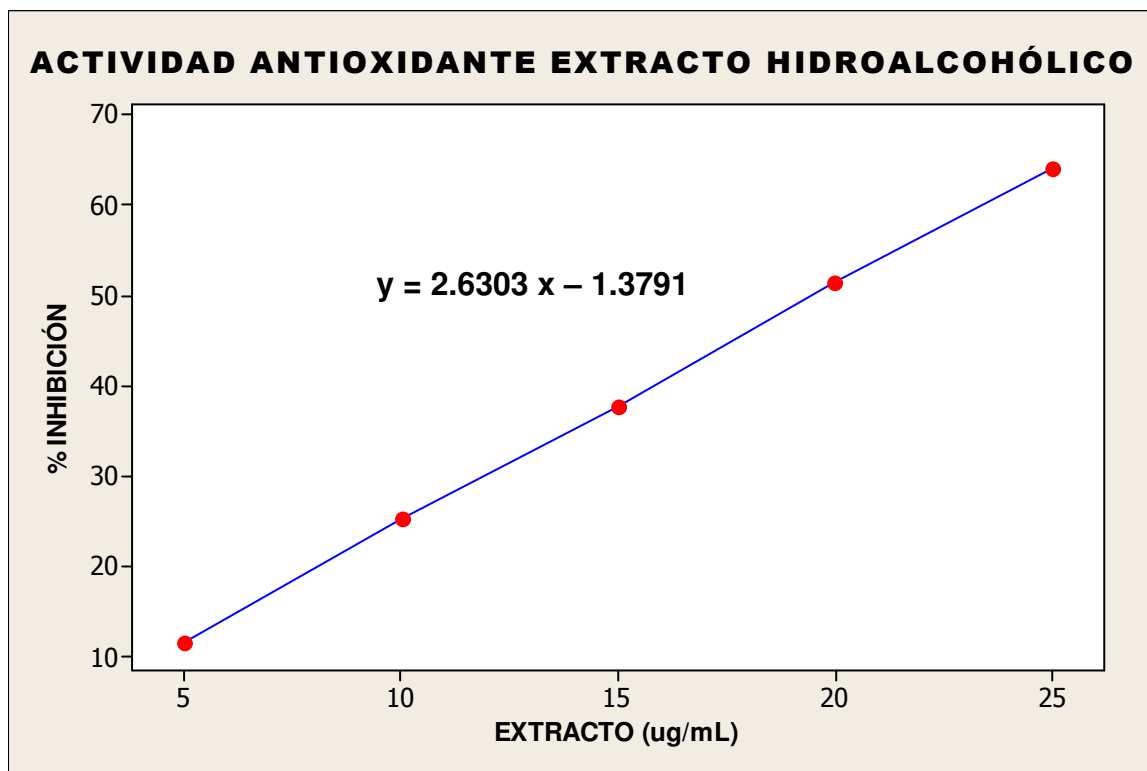


Gráfico Nº 15. Relación del extracto hidroalcohólico en µg/mL versus % inhibición.

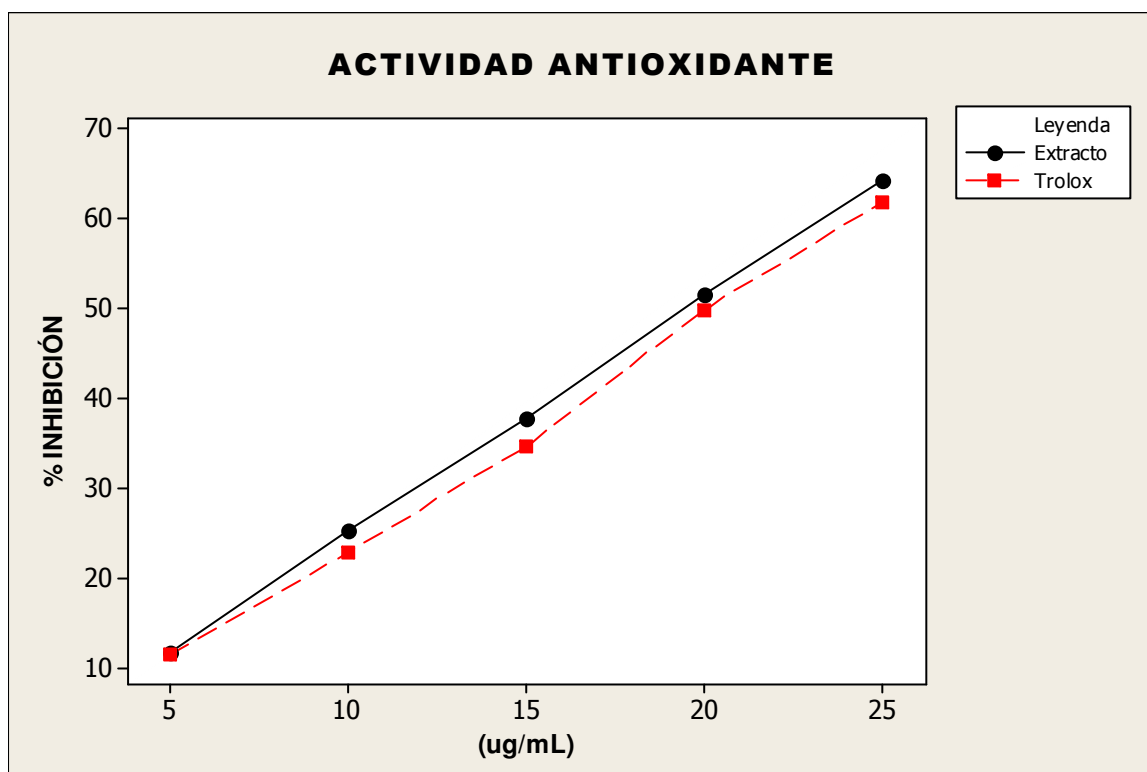


Gráfico Nº 16. Comparación de la gráfica del extracto hidroalcohólico-trolox en µg/mL versus % inhibición.

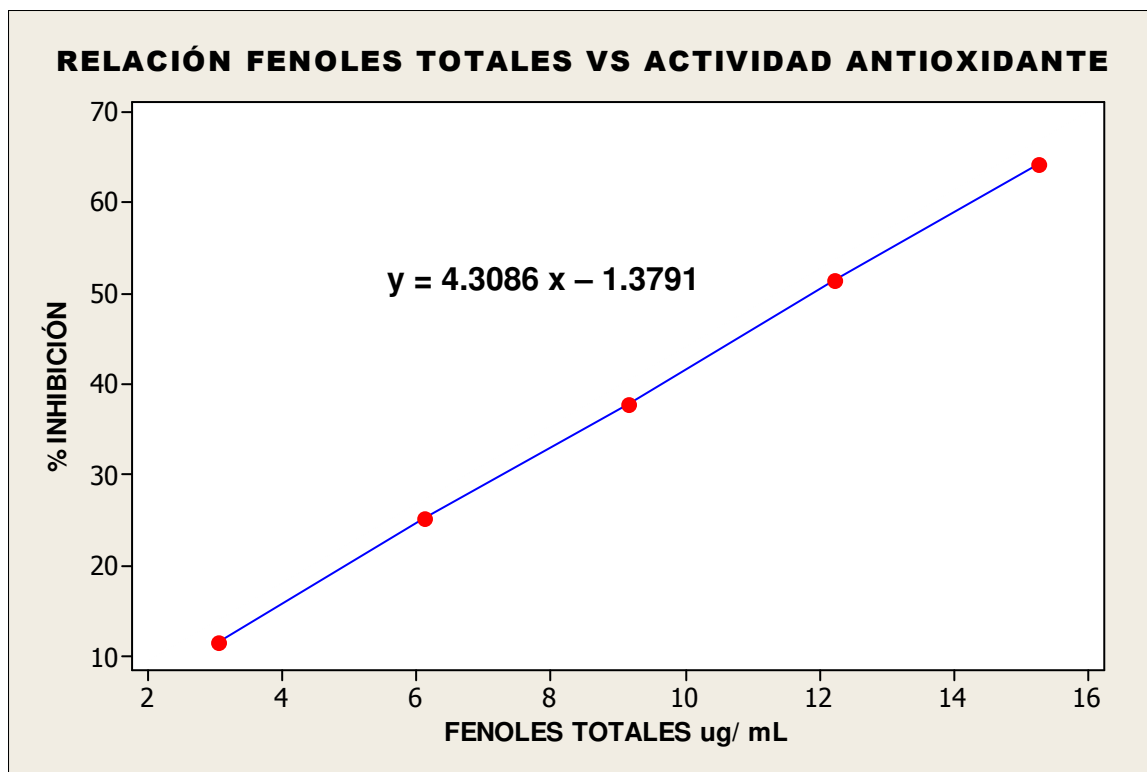


Gráfico N° 17. Relación de la cantidad de compuestos fenólicos totales con la actividad antioxidante, del extracto hidroalcohólico.

Tabla N° 24. Comparación del % de inhibición, ecuación de la recta, coeficiente de correlación, IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) y equivalente trolox; del extracto y el trolox.

PARÁMETRO	<i>Triplaris americana</i> L.					Trolox				
% inhibición	5	10	15	20	25	5	10	15	20	25
	11.6	25.3	37.7	51.5	64.3	11.4	22.8	34.6	49.8	61.7
Ecuación	Y = 2.6303 x – 1.3791					Y = 2.5493 x – 2.1948				
Coef.correl.	0.9998					0.9987				
IC ₅₀ (µg/mL)	19.5337					20.4742				
Equiv. trolox	0.241 mg/mL									

4.5. De la actividad antimicrobiana

Los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico desecado (disuelto en agua desionizada pasteurizada) de la corteza de *Triplaris americana* L. aparecen en la Tabla N° 25. Se evidencia una respuesta de inhibición selectiva con las bacterias Gram positivas y, en relación con la levadura, se apreció una carencia total de efecto inhibitorio.

En la **Foto N° 11** se observa la ausencia de la inhibición del extracto frente a las cepas de *Escherichia coli* (A) y *Pseudomonas aeruginosa* (B). Asimismo en la **Foto N° 13** se denota la ausencia del halo para el extracto frente a *Candida albicans* (E).

En cambio, en la **Foto N° 12** se muestra halos de inhibición marcados del extracto frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* (C) y *Bacillus subtilis* (D).

Tabla N° 25: Actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico desecado de la corteza de *Triplaris americana* L. (Tangarana colorada) frente a distintos microorganismos.

Microorganismo	S	A (mm)	% A	B (mm)	% B	C (mm)	% C
<i>Escherichia coli</i>	28	---	---	---	---	---	---
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24	---	---	---	---	---	---
<i>Staphylococcus aureus</i>	29	7.0 ± 0.436	24.14	13.2 ± 0.493	45.52	17.3 ± 2.551	59.66
<i>Bacillus subtilis</i>	35	6.7 ± 0.7	19.14	11.0 ± 0.8	31.43	14.9 ± 1.51	42.57
<i>Candida albicans</i>	19	---	---	---	---	---	---

Tamaño del halo de inhibición: Diámetro halo con el disco – diámetro disco (6 mm)

A: Lectura promedio ± DS (mm) Extracto 3 mg/ disco

B: Lectura promedio ± DS (mm) Extracto 4 mg/ disco

C: Lectura promedio ± DS (mm) Extracto 6 mg/ disco

S: Lectura promedio ± DS (mm) Estreptomycin (30 ug/ disco para las bacterias) y nistatina (20 ug/ disco para *C. albicans*).

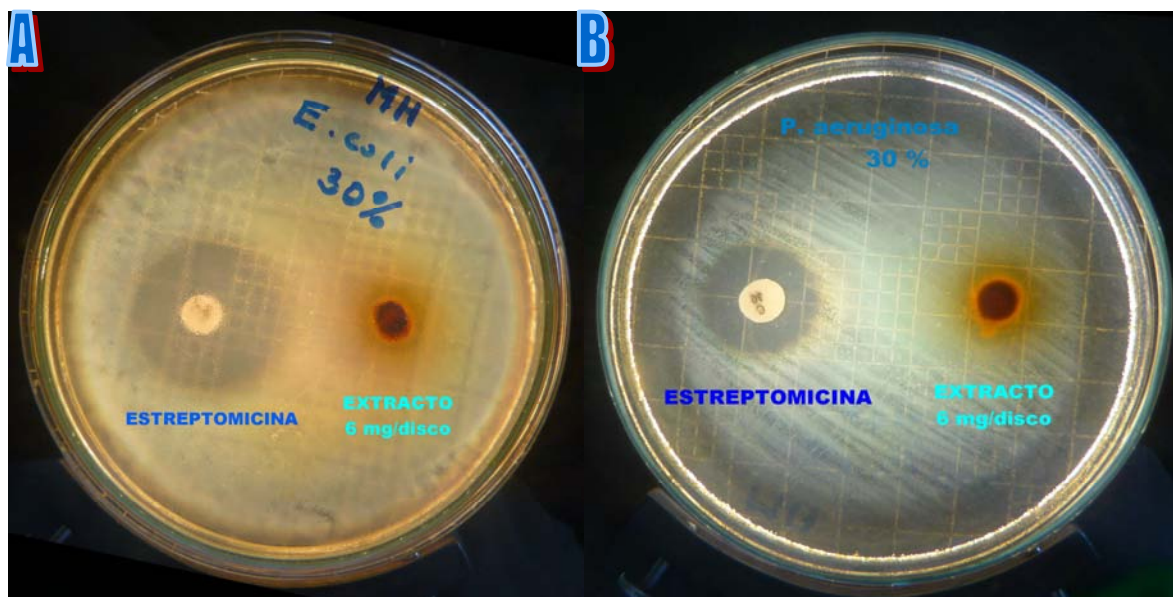


Foto N° 11. Actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico desecado, al 30 % (disuelto en agua desionizada pasteurizada) de corteza frente a *Escherichia coli* (a) *Pseudomonas aeruginosa* (b)

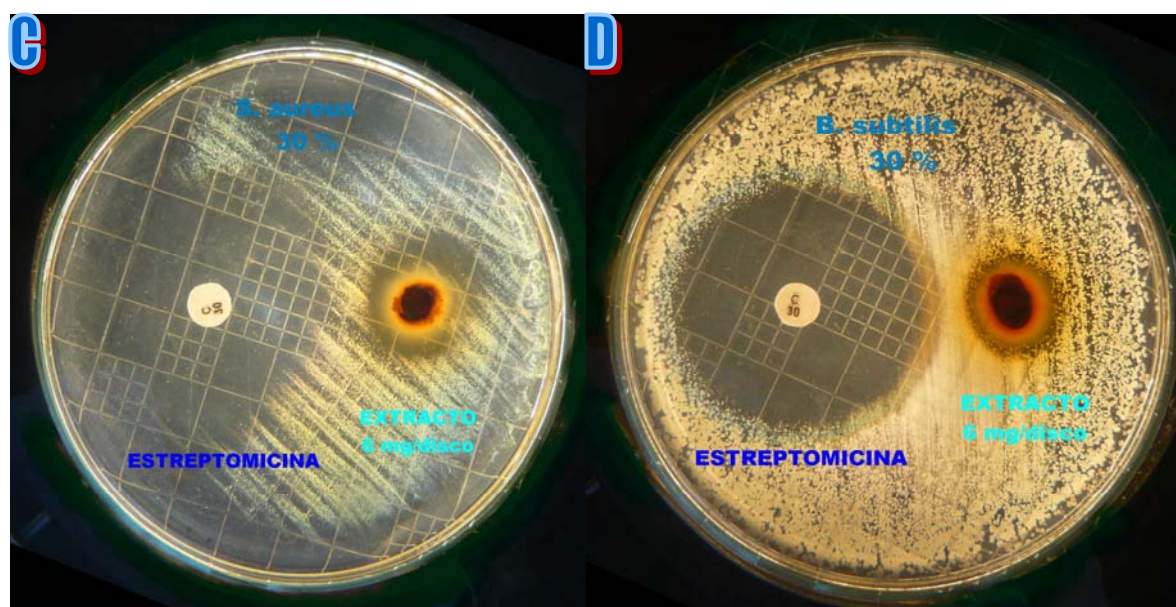


Foto N° 12. Actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico desecado de la corteza frente a *Staphylococcus aureus* (c) *Bacillus subtilis* (d)

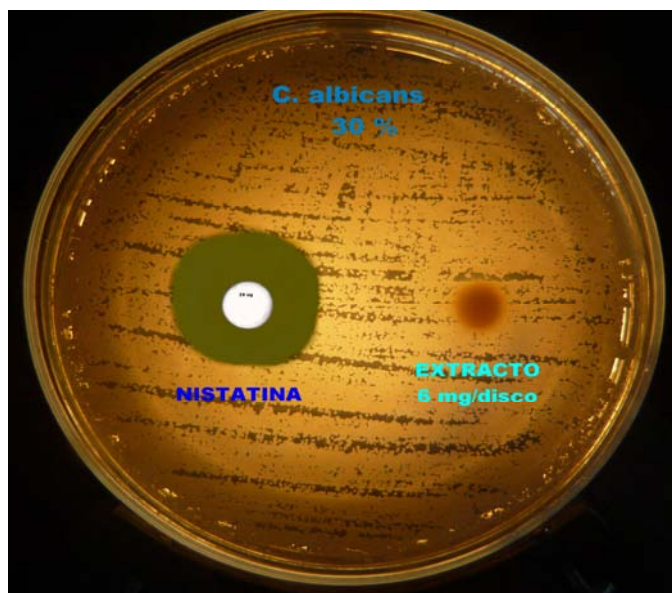


Foto N° 13. Actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico desecado de la corteza frente a *Candida albicans*.

V. DISCUSIÓN

En el extracto hidroalcohólico desecado de la corteza de **Tangarana colorada**, se encontró compuestos fenólicos: taninos, taninos condensados y flavonoides. Luego en el extracto hidroalcohólico, se identificó mediante el espectro UV-visible **las Bandas E (etilénica), K (conjugación), B (benzenoide) y R (radicalaria) para compuestos aromáticos** como se muestra en la Tabla N° 9, encontrándose varios picos de absorción y por lo tanto pueden existir varios cromóforos (varios dobles enlaces), que indican que el extracto hidroalcohólico posee varias sustancias activas, quedando pendiente el aislamiento y purificación de sustancias puras a partir del extracto. Asimismo, en el análisis del espectro Infrarrojo del extracto hidroalcohólico, se obtuvieron lecturas espectrales para grupos funcionales característicos de estos compuestos: **estructuras fenólicas**, que evidencia una absorción a $\lambda_{\text{max}} = 3356.76 \text{ cm}^{-1}$, grupos hidroxilos asociados (**-OH asociado**); $\lambda_{\text{max}} = 1611.82 \text{ cm}^{-1}$, doble enlace de anillos aromáticos (**C=C de anillo aromático**); $\lambda_{\text{max}} = 1520.17 \text{ cm}^{-1}$, tensión de enlace simple del anillo aromático (**C-H anillo aromático**); $\lambda_{\text{max}} = 1281.72 \text{ cm}^{-1}$, flexión de grupos cetónicos para fenoles (**C-O para fenoles**); $\lambda_{\text{max}} = 1108.51 \text{ cm}^{-1}$ y $\lambda_{\text{max}} = 774.02 \text{ cm}^{-1}$, flexiones de enlaces simples del anillo aromático (**C-H anillo aromático**), como se muestra en la Tabla N° 11.^{90, 136-140, 142} Las lecturas espectrales del Infrarrojo obtenidas, se asemejan a las lecturas obtenidas por **Moromi, H., et al**,¹³⁶ en el estudio espectral de las muestras de infusión de té verde (*Camelia sinensis*), donde se determinó la presencia de polifenoles (Anexo N° 5). Entonces, el análisis espectral UV-visible e infrarrojo, realizado al extracto hidroalcohólico desecado, justifica la presencia de compuestos fenólicos.

Los **taninos condensados** como resultado del estudio farmacognóstico, se evaluaron en los espectros UV-visible e Infrarrojo del aislado amílico del hidrolizado del extracto hidroalcohólico desecado (coloración roja); obteniéndose lecturas espectrales similares al extracto hidroalcohólico desecado; asimismo, en el espectro UV-visible se encontraron lecturas para compuestos **fenólicos** $\lambda^{\text{Amílico OH}}$ 270.07 nm y 286.87 nm, no presentes en el espectro del extracto hidroalcohólico desecado¹⁴¹. El estudio realizado es un análisis preliminar a la elucidación estructural, quedando pendiente la investigación de las fracciones aisladas con principios activos mayoritarios, obtenidas por cromatografía en capa fina; por el método del espectro Infrarrojo, UV-Visible y Resonancia Magnética Nuclear, para dilucidar las estructuras de los compuestos mayoritarios. Desde el punto de vista bioquímico la presencia de proantocianidinas permiten inferir un cambio metabólico durante el proceso de crecimiento del ejemplar. Estas variaciones resultan de los cambios en la actividad del complejo enzimático proantocianidina-sintasa, responsable de la biosíntesis de las proantocianidinas. Es conocido que las proantocianidinas pueden desempeñarse como atrapadores de radicales libres y como agentes antibacterianos, antivirales.¹⁴³

Los resultados descritos en párrafos anteriores, se relacionan con el estudio realizado por **Oliveira, P., et al**,¹⁸ en el cual se determina por técnicas RMN los siguientes compuestos fenólicos: **glicósidos fenilpropanoides**: vanicósido; **benzenoides**: ácido gálico y **flavonoles simples y glicósidos** (quercetina y quercetina 3-O- α -L-arabinofuranósido y el estudio realizado por **Hussein, A., et al**,¹⁹ donde se reportaron la presencia de **5 glicósidos flavonoides** en *Triplaris cumingiana*. Sin embargo estos resultados se hallaron en muestras de *Triplaris*, procedentes de Brasil.¹⁸

Luego de determinar cualitativamente taninos (taninos condensados), se procedió a cuantificar los polifenoles totales, taninos y taninos condensados; asimismo se validó el método de cuantificación para el extracto hidroalcohólico desecado; estudio relacionado con la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo, desarrollado por **Lastra, H., et al.** ⁹⁸

Para el caso de la especificidad, se demuestra que en la reacción de la gelatina con el extracto hidroalcohólico desecado disuelto en agua desionizada pasteurizada, no existen compuestos fenólicos, siendo estos compuestos taninos que reaccionaron con gelatina, lo cual confirma el estudio de **Horwitz, W.** ¹⁰⁹ y **Makkor, H** ¹¹⁰ respecto a la especificidad de la gelatina por los taninos.

Las curvas de calibración en el rango de concentraciones estudiadas tanto del patrón como las del extracto en los ensayos A y B, demostraron ser lineales por los coeficientes de correlación superiores a 0,990, al cumplir con la prueba del coeficiente de variación de los factores respuesta inferior al 5 %, que es el límite establecido para el caso en los métodos espectrofotométricos. ⁹⁸⁻¹⁰⁸

Los coeficientes de variación de los estudios de repetibilidad y reproducibilidad cumplen con los criterios de validación analítica. Los tests de *Fisher* y *Student* en el estudio de reproducibilidad no presentaron diferencias significativas con respecto a los valores tabulados (5,05 y 1,81 respectivamente) comprobándose la precisión del método. ^{99-102, 104, 106}

Los valores obtenidos como resultados de los tests de *Student* y de *Cochran* realizados a los porcentajes de recuperación obtenidos del método de adición de patrón, fueron

inferiores a los tabulados (1,86 y 0,87 respectivamente), demostrándose la exactitud del método propuesto.⁹⁸⁻¹⁰⁸

Para el análisis toxicológico del extracto; se acepta hoy que no es necesario definir un valor puntual de DL_{50} para una sustancia y que resulta suficiente ubicar dicha dosis en un rango.¹⁴⁴ Las regulaciones para la ejecución de este tipo de estudio alternativo de toxicidad aguda plantean que si no existen informes anteriores de toxicidad de la sustancia que se investiga es posible utilizar una dosis límite de 2000 mg/ kg de masa corporal, lo que se ajusta a este estudio, además de que el uso tradicional no señale toxicidad al extracto.⁸³

Los taninos son compuestos polifenólicos que desempeñan acciones defensivas en las plantas frente a los insectos. En general tienen acción astringente, antimicrobiana, antifúngica, inhibitoria enzimática, curtir la piel y como antídoto de alcaloides y metales pesados. Se plantea que su toxicidad es baja en principio, pero pueden ocasionar intolerancias gástricas y estreñimiento. Su mecanismo de acción puede estar relacionado con su capacidad para inactivar adhesinas microbianas, enzimas, proteínas transportadoras en la célula, formar complejos con la pared celular, etc. También pueden ligar las proteínas de la piel y de la mucosa, las cuales se transforman en sustancias insolubles.¹⁴⁵ Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten plantear que los polifenoles presentes en la corteza de *Triplaris americana* L. no son tóxicos por vía oral, y el valor de la toxicidad aguda a dosis límite del extracto hidroalcohólico desecado de la corteza, se encuentra por encima de 2 000 mg/kg de masa corporal y no se observaron signos de toxicidad para el Test de Irwin.¹¹⁸

En el análisis de la actividad antioxidante, para conseguir la lectura de absorbancia corregida se procedió a la resta de la lectura de absorbancia del DPPH con la absorbancia de las muestras, debido al color rojo del extracto hidroalcohólico. De los resultados para la

actividad antioxidante mostrados en las Tablas N° 22, 23 y 24, se puede indicar que el extracto hidroalcohólico desecado de la corteza al presentar valor IC₅₀ levemente superior al trolox, posee una capacidad análoga de capturar al radical DPPH. Muchos trabajos relacionan la capacidad antioxidante con el contenido de fenoles totales y los antocianos;¹⁴⁶⁻¹⁵² cada componente fenólico puede contribuir de forma y proporción diferente. Es necesario considerar que dicha correlación no solo depende de la concentración y la calidad antioxidante, sino también de su interacción con otros componentes y la metodología aplicada. En el caso del extracto hidroalcohólico, el cual presentó un valor levemente alto con respecto al Trolox, puede existir una relación con los taninos condensados presentes; por lo cual el extracto podría convertirse en candidato para el aislamiento de sustancias activas como antioxidantes, puesto que este caso la actividad observada equivale al efecto total (sinérgico o no) de la mezcla.¹⁴⁶

En el caso de la actividad antimicrobiana, el uso de la técnica de difusión en disco permite un análisis preliminar eficaz para demostrar efectos antimicrobianos del extracto hidroalcohólico desecado disuelto en agua desionizada pasteurizada. El uso de cepas bacterianas tanto Gram positivas como Gram negativas permitió una idea representativa del efecto inhibitorio sobre estos microorganismos, demostrándose su actividad frente a bacterias Gram positivas. Se realizó un análisis antimicrobiano preliminar al estudio, a las concentraciones: 600 µg/disco, 800 µg/disco y 1 mg/disco; del extracto hidroalcohólico desecado disuelto en agua desionizada pasteurizada, frente a las mismas cepas descritas en el párrafo anterior. Se encontró actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*; 10.34 % de inhibición a 1 mg/disco de extracto, por lo cual se decidió continuar con el estudio antimicrobiano a mayores concentraciones de extracto por disco.^{129-131, 133, 134}

VI. CONCLUSIONES

1. El estudio del extracto hidroalcohólico de la corteza, ha comprobado la presencia de carbohidratos, heterósidos, compuestos fenólicos: taninos condensados (proantocianidinas) y flavonoides; la presencia de grupos fenólicos (grupo hidroxilo, grupo aromático), se realizó mediante espectroscopía infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) y espectroscopía UV-visible; en el extracto hidroalcohólico y el aislado amílico del hidrolizado del extracto hidroalcohólico desecado.
2. La cuantificación del extracto hidroalcohólico dió como resultado: para compuestos fenólicos totales: 13.5158 ± 0.1825 g de ácido tánico/ 100 g de corteza; para taninos: 11.8590 ± 0.5453 g de ácido tánico/ 100 g de corteza; y la determinación de taninos condensados: 1.62368 ± 0.0784 g de ácido tánico/ 100 g de corteza.
3. El extracto hidroalcohólico desecado de la corteza de *Triplaris americana* L., disuelto en agua desionizada pasteurizada a 80° C, posee actividad antioxidante con IC₅₀ de 19.5337 µg/mL, y 0.241 mg/mL equivalentes trolox; asimismo presenta actividad antimicrobiana frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.
4. En las condiciones del ensayo no se produjo mortalidad ni se manifestaron signos indicativos de toxicidad en los animales. La toxicidad de los extractos de estudio se encuentra por encima de 2000 mg/kg de masa corporal, calificándose según el Sistema Global Armonizado, como “No clasificadas” (“No tóxicas”).

VII. RECOMENDACIONES

1. Los resultados obtenidos en la actividad antioxidante, dan un indicio sobre la posibilidad de utilizar la especie *Triplaris americana* L. como planta promisoría para el aislamiento y purificación de compuestos fenólicos con actividad antioxidante superiores a la actividad del trolox. Debido al resultado, se puede utilizar como principio activo o excipiente en productos naturales, alimentos y cosméticos.
2. El resultado favorable a 6 mg/disco del extracto frente a bacterias Gram positivas puede determinar un posible efecto conservador si se desea incluir el extracto como aditivo alimentario, excipiente cosmético, entre otros; lo cual produce importancia la actividad frente a *Staphylococcus aureus*, bacteria muy contaminante en la industria.
3. Asimismo por el alto contenido de taninos demostrado en el extracto, puede denotar una acción antitumoral, antidiarreico, cicatrizante, hipocolesterolémico, hemostático, entre otras actividades pendientes por demostrar en próximos estudios de investigación.
4. Por estos motivos, recomiendo la promoción del cultivo extensivo y conservación de la especie *Triplaris americana* L.; debido a la extinción de esta especie en la selva peruana. Siendo la presente investigación, el inicio de los datos científicos para nuestra especie peruana que avalan y promueven los siguientes estudios de investigación.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Vidal, A.; Motidome, M.; Mancini, J.; Fallarero, A.; Midori, M.; et al.** Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelim) Howe. Revista Brasileira de Ciencias Farmacéuticas. 2001; 37 (3): 373-82.
2. **Cairo, Y.; Jurado, B.; Espinoza, S.; Cotos, C.; Ponce, L.** Cuantificación de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante del extracto foliar acuoso de *Anacardium occidentale* “Marañón”. Jornadas de Investigación de la Facultad de Medicina Humana. Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición, Laboratorio de Química Bioorgánica. Facultad de Medicina y Laboratorio de Farmacología y Medicina Tradicional. UNMSM. 2008.
3. **Murphy, M.** Plants products as antimicrobial agents. Oxford, Ohio. 1999: 564-582.
4. **Desmarchelier, C.; Alonso, J.** Plantas Medicinales para la atención primaria en la salud. Vademécum de Fitoterapia – 2005. PRODAPP. Lima . 2005.
5. **Desmarchelier, C; Witting, F.** Sixty Medicinal Plants from the Peruvian Amazon: Ecology, Ethnomedicine and Bioactivity. Primera edición. Ediciones PROTERRA. Lima. 2000.
6. **Mostacero, L.; Mejía, F.; Gamarra, O.** Taxonomía de las Fanerógamas útiles del Perú. CONCYTEC. Volumen I. Editora Normas Legales S.A.C. Trujillo. 2002.
7. **Deharo, E.; Baelmans, R.; Gimenez, A.; Quenevo, C.; Bourdy, G.** *In vitro* immunomodulatory activity of plants used by the Tacana ethnic group in Bolivia. Phytomedicine. 2004; 11: 516-522.

8. **Bourdy, G.** Tacana: conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas (Tacana: ecuanasha aquí, ecunasha id'renecuana, me schanapaque). FONAMA-IRD. UMSA. CIPTA. La Paz. 1999
9. **Mayca, J.; Medina, A.; Niño de Guzmán, A.** Uso de plantas medicinales en comunidades nativas del distrito de río Santiago, Amazonas. SALUD INTERCULTURAL. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. 2003; 20.
10. **Melo, E.** Acta Botánica Brasilica. 2000; 14: 273.
11. **Brandbyge, J.** Polygonaceae. Harling, G. y L. Andersson, eds. Flora de Ecuador. 1989. 38.
12. **Brack, A.** Diccionario Enciclopédico de Plantas útiles de Perú. PNUD. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas. Cuzco. 1999.
13. **Vitold de Szyszlo.** La naturaleza en la América Ecuatorial. San Marti y CIA. Lima. 1955.
14. **Brako, L.; Zarucchi, J.** Catálogo de las plantas con flores y gimnospermas del Perú. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 45. Lima. 1993.
15. **Furnari, G.; Guglielmo, A.; Longhitano, N.; et al.** Tabla de botánica sistémica. Departamento de Botánica. Universidad de Catania. 2008.
16. **Muñoz, V.; Sauvain, M.; Bourdy, G.; Callapa, J.; Deharo, E.; et al.** The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosecene indians. Journal of Ethnopharmacology. 2000; 69: 139-155.
17. **Desmachelier, C.; Repetto, M.; Coussio, J.; Llesuy, S.; Ciccía, G.** Int. J. Pharmacog. 1997; 35: 288.

18. **Oliveira, P.; Conserva, L.; Lemos, R.** Chemical constituents from *Triplaris americana* L. (Polygonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. Maceió.2008; 36: 134-137.
19. **Hussein, A.; Barberena, I.; Correa, M.; Coley, P.; Solis, P.; et al.** Cytotoxic Flavonol Glycosides from *Triplaris cumingiana*. *Journal Natural Products*. 2005. 68: 231.
20. **Andreo, C.; Vallejos, R.** Fotosíntesis. Secretaría General de La Organización de Estados Americanos. Washington. 1984.
21. **Granados, D.; Castañeda, A.; Mendoza, O.** Ecología vegetal. Interacciones ecológicas de las plantas. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 1989.
22. **Kinsella, J.; Frankel, E.; German, B.; Kanner, J.** Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*. 1993; 85-9.
23. **Ortega, T.; Carretero, M.; Pascual, E.; Villar, A.; Chiriboga, X.** Anti-inflammatory activity of ethanolic extracts of plants used in traditional medicines in Ecuador. *Phytotherapy Res*. 1996; 10(1): 121-2.
24. **Lin, C.** Novel antiplatelet constituents from Formosan Moraceous plants. *J Nat Prod* 1996; 59(9): 834-8.
25. **Hamilton-Miller, J.** Antimicrobial properties of tea (*Camellia Sinensis* L.) antimicrobial agent chemotherapy. 1995; 39(11): 2375-7.
26. **Stoner, G.; Mukhtar, H.** Polyphenols as cancer chemo preventive agents. *J Cell Biochem Suppl* 1995; 22: 169-80.
27. **Samuelsson, G.** Inventory of plant used in traditional medicine in Somalia. II. Plants of the family Combretaceae to Labiatae. *Journal Ethnopharmacology*. 1992; 37(1): 47-70.

28. **Ficarra, R.** Isolation and characterization of *Guiera senegalensis* J. F. Gmel. Active principles. Boll. Chim. Farm. 1997; 136 (5): 454-9.
29. **Hernández, M.; Prieto, E.** Plantas que contienen polifenoles. antioxidantes dentro del estilo de vida. Revista Cubana Invest Biomed. 1999; 18(1): 12-4.
30. **Leighton, F.; Urquiaga, I.** Polifenoles del vino y salud humana. Antioxidantes y calidad de vida. 2000; 7: 5-13.
31. **Bruneton, J.** Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales. Editorial Acribia S.A. Segunda Edición. Zaragoza. 2001.
32. **Kuklinski, C.** Farmacognosia. Editorial OMEGA S.A. Barcelona . 2000.
33. **Trease–Evans.** Farmacognosia. Ediciones Mc.Graw Hill. Editorial Interamericana. Décimo Tercera Edición. México D.F. 1991.
34. **Villar, A.** Farmacognosia general. Editorial Síntesis. Madrid. 1999.
35. **Peris, J.; Studing, G.; Vnaglosa B.** Heterósidos. Fitoterapia aplicada. Valencia. 1995: 67-8.
36. **Escaray, F.; Pesqueira, J.; Pieckenstain, F.; Carrasco, P.; Ruiz, O.** Taninos condensados y antocianinas en el género Lotus: su relación con el estrés salino en especies forrajeras para zonas marginales. Disponible en: <http://www.iib.unsam.edu.ar/IIB-INTECH/html/papiros/papiros/2007Escaray.pdf>
37. **Taiz, L.; Zeiger, E.** Secondary metabolites and plant defense. Plant Physiology. Fourth Edition. Sinauer Associates. Capítulo 13. 2006.
38. **Felton, G.; Donato, K.; Del Vecchio, R.; Duffey, S.** Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. Journal of Chemical Ecology. 1989; 15: 2667-94.

39. **Butler, L.** Effects of condensed tannin on animal nutrition. RW Hemingway y JJ Carchesy (editores). Chemistry and significance of condensed tannins. Plenum. Nueva York. 1989: 391-402.
40. **Martínez, T.; Barroso, F.; Paz, M.** Relación entre la herbivoría simulada y contenido en taninos de la sarguilla (*Periploca laevigata*: Asclepidaceae). Área de Biología Animal. Departamento de Biología Aplicada. CITE II-B. Universidad de Almería. Disponible en:
http://www.exopol.com/general/seoc/comunicaciones/26_73.pdf
41. **Anaya, A.; Espinosa, F.; Cruz, R.** Relaciones químicas entre organismos: Aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. Publicado por Plaza y Valdés 2001.
42. **Semarnat.** Extracción: Colorantes y taninos. Disponible en:
<http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/Taninos.html>
43. **Castillo, E.; Martínez, I.** Manual de Fitoterapia. Elsevier. España. 2007.
44. **Peña, A.** En la calidad de uvas y vino. Los taninos y su importancia. Informe enológico. 2006: 18-20.
45. **Halliwell, B.** Oxidative stress, nutrition and health. Free Radic. Res. 1996; 25: 57-74.
46. **Pryor, W.** Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. Ann. Rev. Physiology. 1986; 48: 657-67.
47. **Slater, T.** Free radical mechanisms in tissue injury. Journal Biochemistry. 1984; 222: 1-15.
48. **Pryor, W.** Xenobiotics, cancer and aging, in: vitamin E: Biochemical. Hematological and Clinical Aspects. Free Radical Biology. 1982; 24: 10-25.
49. **Rodríguez, J.; Menéndez, J.; Trujillo, Y.** Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Revista Cubana de Medicina Militar. 2001; 30(1): 36-44.

50. **Herbert, V.; Shaw, S.; Jayatilleke, E.; Stopler-Kasdan, T.** Most free-radical injury is iron-related: it is promoted by iron, hemin, holoferitin and Vitamin C, and inhibited by desferoxamine and apoferritin. *Stem Cells*. 1994; 12: 289-303.
51. **Goldman, G.; Welbowan, R.** Oxygen free radicals are required for ischemia-induced leukotriene B4 diapedesis. *Surgery III*. 1992; (3): 287-93.
52. **Hidalgo, M.; Fernández, E.; Cabello, A.; Rivas, C.; Fontecilla, F.; et al.** Evaluación de la respuesta antioxidante en *Chiton granosus* Fremby, 1928 (Mollusca: Polyplacora) a contaminantes oxidativos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 2006; 41 (2): 155-65.
53. **Sies H.** Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med*. 1991; 91: 31S-39S.
54. **CIBN** (Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición). Capacidad atrapadora de radicales libres. Primer Curso Nacional Teórico Práctico: Antioxidantes en Recursos Fitoterapéuticos. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2006.
55. **Hayflick, L.** Theories of biological aging. *Experimental Gerontology*. 1985; 20: 145-9.
56. **Wolf, S.; Barrer, A.; Dean, R.** Free radicals, lipid and protein degradation. *Trends in Biochemical Sciences* 1986; 11: 27-31.
57. **Di Mascio, P.; Murphy, M.; Sies, H.** Antioxidant defense systems: The rol of carotenoids, tocopherols, and thiols. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1991; 53: 194S-200S.
58. **Bast, A.; Haenen, G.; Doelman, C.** Oxidants and antioxidants: State of the Art. *American Journal of Medicine*. 1991. 91(supl. 3C): 2-13.
59. **Sauberlich, H.** Pharmacology of vitamin C. *Annual Review of Nutrition*. 1994; 14: 371-391.

60. **PalYu, B.** Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*. 1994. 73(1): 139-62.
61. **Cotgreave, I.; Moldeus, P.; Orrenius, S.** Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1988; 28: 189-212.
62. **Larson, R.** Naturally occurring antioxidants. CRC Press LLC. 1997: 116.
63. **Shils and Young.** *Modern Nutrition in Health and Disease*. 7th edition. 1988; 342-4.
64. **Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M.** Antioxidants in Food: Practical Applications. CRC Press. Woodhead Publishing Limited. Cambridge. 2001.
65. **Cartron E.; Carboneau M.; Fouret G.; Descomps, B.; Leger, C.** Specific antyoxidant activity of caffeoyl derivatives and another natural phenolic compounds: LDL protection against oxidation and decrease in the proinflammatory lisophosphatidylcholine production. *Journal Natural Product*. 2001; 64: 480-6.
66. **Pietta, P.** Flavonoides as antioxidant. *Journal Natural Product*. 2000; 63: 1035-49.
67. **Saha, K.; Lajis, N.; Israf, D.; Syahide, A.** Evaluation of antioxidant nitric oxid inhibitory activites of select Malaysian medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 92 (2-3): 263-7.
68. **Bravo L.** Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 1998; 56 (11): 317-333.
69. **Pannala, A.; Chan, T.; O'Brien, P.; Rice-Evans, C.** Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast-reaction kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2001; 282: 1161-1168.
70. **Rice-Evans, C.; Miller, N.; Paganga, G.** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 1996; 20: 933-56.

71. **Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R.** Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol Med.* 1997; 22: 749-60.
72. **Harborne, J.; Williams, C.** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* 2000; 52: 481-504.
73. **Lapidot, T.; Harel, S.; Akiri, B.; Granit, R.; Kanner, J.** pH-Dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 67-70.
74. **Prior, R.; Cao, G.; Martin, A.; Sofic, E.; Mcewan, J.; O'Brien, C.; et al.** Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium specie*. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46: 2686-93.
75. **Sánchez-Moreno, C.** Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. *Actividad antioxidante. Alimentaria.* 2002: 29-40.
76. **Saute-Gracia, M.; Heinonen, M.; Frankel, E.** Anthocyanin as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *J. Agric. Food Chem.* 1997; 45: 3362-7.
77. **Schramm, D.; German, J.** Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. *J. Nutr. Biochem.* 1998; 9: 560-6.
78. **Tsuda, T.; Watanabe, M.; Ohshima, K.; Norinobu, S.; Choi, S.; et al.** Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-b-D glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.* 1994; 42: 2407-10.
79. **Dastmalchi, K.; Dorman, D.; Kosarb, M.; Hiltunen, R.** Chemical composition and *in vitro* antioxidant evaluation of a water soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. *L.W.T.* 2007; 40 (240): 239-48.

80. **Wallace, J.** Symposium on Plants as animal foods case of catch 22 Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. 2004.
81. **Walton, N.; Brown, D.** Chemical from plants. Perspectives on plant secondary products. Imperial College Press. 1999.
82. **Guerra, M.; Vega, R.; Rivero, R.; Menéndez, R.; Gutiérrez, A.; et al.** Actividad antimicrobiana y toxicidad de un extracto acuoso de *Boerhaavia erecta* L. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2004.
83. **Bermúdez, D.; Monteagudo, E.; Boffill, M.; Díaz, L.; Roca, A.; et al.** Evaluación de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales por un método alternativo. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504. 2007; 3 (VIII): 1-7.
84. **Cotillo, P., Rojas, L.** Métodos farmacológicos en la investigación de productos vegetales. CONCYTEC. Lima. 1990.
85. **OECD.** Guidelines for testing of chemicals. Acute oral toxicity. Acute Toxic Class Method. Organization for Economic Co-operation and Development. Guide No. 423, 2000 [Revised Draft Guideline October 2000]. URL disponible en: <http://www.oecd.org>
86. **Ricco, R.; Vai, M.; Sena, G.; Wagner, M.; Gurni, A.** Taninos condensados de *Ephedra ochreatea* Miers (Ephedraceae). Acta Farmacéutica Bonaerense. 2003; 22 (1): 33-7.
87. **Waterman, P.; Mole, S.** Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications, Ed. Cambridge, MA. USA. 1994: 67-133.
88. **S.E.C.F.** Diccionario Forestal. Mundi-Prensa Libros. 2005.
89. **Miranda, M.** Métodos de análisis de drogas y extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Ciudad de la Habana. 2002.
90. **Lock, O.** Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de Productos Naturales. Primera edición. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica. Lima. 1994.

91. **Gibaja, S.** Guía para el análisis de los compuestos del carbono. UNMSM. Dirección Universitaria de Biblioteca y Publicaciones. Editorial UNMSM. Lima. 1977.
92. **Gorriti, A.; Jurado, B.; Quispe, F.** Manual de Laboratorio I y II. UNMSM. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Cátedra de Farmacognosia y Medicina Tradicional. Lima. 2004.
93. **Randerath, K.** Cromatografía en Capa Fina. Enciclopedia de la Química Industrial. Tomo VIII. 2º Edición. Editorial Urmo, S.A. Bilbao. España. 1970.
94. **Stahl, E.** Thin Layer Chromatography. Academic Press Inc Publishers. New York. U.S.A. 1965.
95. **Nitao, J.; Birr, B.; Nair, M.; Herms, D.; Mattson, W.** Rapid quantification of proanthocyanidins (condensed tannins) with a continuous flow analyzer. J. Agric. Food Chem. 2001; 49: 2207-14.
96. **Ricco, R.; Sena, G.; Vai, V.; Wagner, M.; Gurni, A.** Taninos condensados de *Ephedra chilensis* K. Presl (=E. andina Poepp. Ex May.) –Ephedraceae-. Cátedra de Farmacobotánica. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Buenos Aires. 2002.
97. **Ricco, R.; Kathrein, F.; Lozano, V.; Wagner, M.; Gurni, A.** Taninos condensados de *Ephedra frustillata* Miers (Ephed₁₀₄). Acta Farmacéutica Bonaerense. 2005; 25 (2): 192-7.
98. **Lastra, H.; Rodríguez, E.; Ponce, H.; González, M.** Método analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2000; 5 (1): 17-22.
99. **Gutiérrez, Y.; Miranda, M.; Varona, N.; Rodríguez, A.** Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en *Psidium guajaba* L. Revista Cubana de Farmacia. 2000; 34 (1): 50-5.

100. **Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria.** Validación de Métodos Analíticos. 2^{da} Edición. Barcelona. AEFI. 2001.
101. **Eurachem.** The fitness for purpose of Analytical Methods. A laboratory guide to method validation and related topics. 1998. Disponible en:
<http://www.eurachem.org/guides/valid.pdf>
102. **ICH International Conference on Harmonisation (ICH): Q2 (R1)** Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology
Note: In November 2005, the ICH incorporated Q2B on methodology with the parent guidance Q2A and retitled the combined Q2 document. The contents of the two guidances were not revised. Disponible en:
<http://www.fda.gov/cber/gdlns/ichq2bmeth.pdf>
103. **García, C.; Concepción, J.; Gómez, F.; Fusté, V.** Desarrollo y Validación de un Método Analítico para el control de Calidad de Ergocalciferol Inyectable al 0.5 %. Latin America Journal of Pharmacy (formely Acta Farmacéutica Bonaerense). 2007; 26 (1): 103-7.
104. **Ministerio de Salud.** Guía de validación de métodos analíticos. Disponible en:
<http://www.ministeriodesalud.go.cr/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf>
105. **García, C.; Romero, J.; Muñoz, A.; Martínez, V.** Validación de un Método Analítico para el estudio de Estabilidad del Ungüento de Aloe. Latin American Journal of Pharmacy (formely Acta Farmacéutica Bonaerense). 2008; 27 (4): 568-602.
106. **Cohen, Y.** Análisis químicos farmacéuticos de medicamentos. Uteha. Noriega editores. Balderas. 1998.
107. **Ramos, Y.; Méndez, J.** Validación del método analítico de la triyodotironina sódica. Farmacia hospitalaria. 2003; 27 (1): 26-30.

108. **Castillo, G.; Altuna, B.; Michelena, G.; Sánchez-Bravo, J.; Acosta, M.** Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Biología*. 2005; 27: 137-42.
109. **Horwitz, W.** Official Methods of Analysis of the Association of official Analytical Chemists. 11 ed. Washington, DC. AOAC. 1970:241-2.
110. **Makkor, H.** Protein precipitation methods for quantitation of tannins. *J. Agric Food Chem.* 1989; 37(4):197-202.
111. **Quesada, V.; Vergara, J.** Estadística básica con aplicaciones en Ms. Excel.
112. **Ávila, H.** Introducción a la metodología de la investigación. 2006. Texto completo en: www.eumed.net/libros/2006c/203/
113. **Marín, C.** Epidemiología – (SP-2216). I Ciclo lectivo 2003. Escuela de Salud Pública. Sistema de estudios de post grado. Universidad de Costa Rica. Disponible en:
http://ccp.ucr.ac.cr/~icamacho/epidem_occidente_03/contenido/tlpenf203.ppt
114. **OECD.** Guideline for testing of chemicals. Organization for Economic Co-operation and Development. Guide No. 425, 2001. Up and Down Procedure. URL disponible en: <http://www.oecd.org>
115. **Organization for Economic Co-operation and Development.** Revised Draft Guideline 420. Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. OECD Guideline for Testing of Chemicals, 2000. URL disponible en: <http://www.oecd.org> [fecha de acceso 10 de julio de 2006]
116. **OECD.** Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental. Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, 1998 in November 1998. Organization for Economic Co-operation and Development. [Revised

- November 1998]. URL disponible en: <http://www.oecd.org/ehs/class/HCL6.htm> [fecha de acceso 15 de septiembre de 2006]
117. **Dipascuale, L.; Wallace, H.** Acute toxicity and eye irritancy. En: Principles and Methods of Toxicology. 4 edición. Philadelphia: Taylor and Francis, 2001; 4a: 853-917.
118. **Carreño, M.; Rojas, L.** Farmacología experimental pre-clínica. Un método de aprendizaje de la Farmacología para el estudiante. Primera parte. Cátedra de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. 2005.
119. **Chávez, J.; Chire, T.; Loayza, L.** Capacidad antioxidante de compuestos bioactivos. Principios bioactivos de plantas andinas y amazónicas del Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. 2007.
120. **Arnao, M.; Cano, A.; Acosta, M.** Total antioxidant activity in plant material and its interest in food technology. 1998.
121. **Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.; Berset, C.** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss. u-Technol. 1995; 28: 25-30.
122. **Rapisarda, P.; Tomaino, A.; Lo Cascio, R.; Bonina, F.; De Pasquale, A.; et al.** Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. J. Agric. Food Chem. 1999; 47: 4718-23.
123. **Robards, K.; Prenzler, P.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W.** Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chemistry. 1999; 66: 401-36.
124. **Jeller, A.; Silva, D.; Liao, L.; Bolzani, S.; Burlan, M.** Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*. Phytochemistry. 2004; 65: 1977-82.

125. **Murias, M.; Jager, W.; Handler, N.; Erker, T.; Horvath, Z.; et al.** Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: Structure activity relationship. *Biochemical Pharmacology*. 2005; 69: 903-12.
126. **Rathee, J.; Patro, B.; Mula, S.; Garre, S.** Antioxidant activity of piper betel leaf extract and its constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54: 9046-54.
127. **Aquino, R.; Cáceres, A.; Morelli, S.; Rastrelli, L.** An extract of *Tagetes lucida* and its phenolic constituents as antioxidants. *Journal Natural Product*. 2002; 65: 1773-6.
128. **Chung, Y.; Chen, S.; Hsu, C.; Chang, C.; Chou, S.** Studies on the antioxidative activity of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther. *Food Chem*. 2005; 91: 419-24.
129. **Guiza, D.; Rincón, L.** Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* combinado con inactivación térmica, sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá. 2007.
130. **Koneman, E.** Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 1999.
131. **Rodríguez, O.; Torrenegra, R.; Bustos, D.** Actividad antimicrobiana de *Cuphea ciliata* Ruiz & Pav. (Lythraceae). *Scientia Et Técnica*. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira. 2007; XIII (33): 259-60.
132. **Rotman, A.; Ahumada, O.; Demo, M.; Oliva, M.; Turina, A.; et al.** Flavour Fragr J. 2003; 18: 211-4.
133. **Ijaz, A.; Anwar, F.; Tufail, S.; Przybylski, R.** Chemical composition, an antioxidant and antimicrobial activity of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*. 2008; 108: 986-95.

134. **Martínez, M.; Molina, N.; Boucourt, E.** Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (guayaba). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 1997; 2(1): 12-14.
135. **García, F.** Tema 4b: Tejidos conductores: El Floema. Unidad Docente de Botánica. Escuela Técnica Superior del Medio Rural y Enología. Universidad Politécnica de Valencia. Diapositivas 1-54.
136. **Moromi, H.; Martínez, E.; Villavicencio, J.; Burga, J.; Ramos, D.** Efecto antimicrobiano *in vitro* de la *Camellia sinensis* sobre bacterias orales. Odontología Sanmarquina. 2007; 10 (1): 18-20.
137. **Silverstein, R.; Webster, F.** Spectrometric Identification of Organic Compounds. 6^º Ed. New York. 1998.
138. **Conley, R.** Espectroscopía infrarroja. Edición Alhambra. Madrid. 1979.
139. **Universidad Central de Venezuela.** Guía para análisis de muestra por infrarrojo. Instrumental Analítico. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Universidad Central de Venezuela. Caracas. 2003.
140. **Creswell, C.; Runquit, O.; Campbell, M.** Análisis espectral de compuestos orgánicos. Editorial Diana. México. 1979.
141. **Facultad de Ciencias Químicas.** Espectrometría: Espectrometría visible y ultravioleta. Universidad Autónoma de Chihuahua. Pag. 1-8.
142. **Bender, G.** Métodos instrumentales de análisis en química clínica. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. 1992.
143. **De Bruyne, T.; Pieters, L.; Witvrouw, M.; De Clercq, D.; Vlietinck, A.; et al.** Journal Natural Product. 1999; 62: 954-8.

144. **Kennedy, G.; Ferenz, R.; Burgess, B.** Estimation of acute oral toxicity in rats by determination of the approximate lethal dose rather than the LD₅₀. J. Appl. Toxicol, 1986. 2001; 6: 145-8.
145. **Martínez, A.** Flavonoides. Artículo de Tesina. Universidad de Antioquia, Colombia: Facultad de Química Farmacéutica. 2005.
146. **Vásquez, A.; Cala, M.; Miranda, I.; Tafurt, G.; Martínez, J.; et al.** Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia*. Scientia et Technica. Santander. 2007; XIII (33).
147. **Frankel, E.; Waterhouse, A.; Teissedre, P.** Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoproteins. J. Agric. Food Chem. 1995; 43: 890-4.
148. **Imeh, U.; Khokhar, S.** Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. J. Agric. Food Chem. 2002; 50: 6301-6.
149. **Pinelo, M.; Monzzoco, L.; Nuñez, M.; et al.** Interaction among phenolics in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. J. Agric. Food Chem. 2004; 52: 1177-80.
150. **Roberts, W.; Gordon, M.** Determination of the antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay. J. Agric. Food Chem. 2003; 51: 1486-93.
151. **Sun, J.; Chu, Y.; Wu, X.; Liu, R.** Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. J. Agric. Food Chem. 2002; 50: 7449–54.
152. **Ursini, F.; Tubaro, F.; Rapuzzi, P.; Zamburlini, A.; Maiorino, M.** Wine antioxidants: Effects *in vitro* and *in vivo*. Wine and Human Health. Udine. 1996: 9-11.

IX. ANEXOS

ANEXO N° 1: Certificado botánico de *Triplaris americana* L.

José R. Campos de la Cruz
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Teléfono: 537 3629
e-mail: joricampos@yahoo.es



CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ, Biólogo Colegiado, CBP 3796.

Certifica que:

MIGUEL ANGEL INOCENTE CAMONES

Bachiller en Farmacia y Bioquímica. Ha solicitado la determinación científica de una planta conocida con el nombre vulgar de “tangarana colorada”, la muestra ha sido estudiada y determinada científicamente como: *Triplaris americana* L. Según el Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist et. al. 1981, ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO	: PLANTAE
DIVISIÓN	: MAGNOLIOPHYTA
CLASE	: MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	: CARYOPHYLLIDAE
ORDEN	: POLIGONALES
FAMILIA	: POLYGONACEAE
GENERO	: <i>Triplaris</i> Loefl. Ex L.
ESPECIE	: <i>Triplaris americana</i> L.

Nombre vulgar: “tangarana colorada”

Se expide la presente certificación para los fines que estime conveniente.

Lima, 23 de enero del 2008




José R. Campos De la Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

Jirón Sánchez Silva N° 156. Urbanización Santa Luzmila-Lima

ANEXO Nº 2: Fotos de la corteza molida, extracto hidroalcohólico desecado y pulverizado.



ANEXO Nº 3: Certificado del espectro Infrarrojo del extracto hidroalcohólico desecado (EHA) y el aislado amílico del hidrolizado del extracto hidroalcohólico desecado (EHB)

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA UNIDAD DE SERVICIOS DE ANÁLISIS QUÍMICOS</p>	
---	---	---

INFORME DE ENSAYO
Nº 511-08

Cliente : MIGUEL ANGEL INOCENTE
Dirección : LIMA
Atención : Sr. Miguel A. Inocente (Carta 02/10/08)
Referencia USAQ : 350-01/02
Cotización : 367-2008/USAQ
Muestras : EHA / EHB
Fecha de Recepción : 17/10/08
Fecha de Emisión : 20/10/08

RESULTADO DE ANÁLISIS DE: EHA / EHB

No. USAQ	COD. CLIENTE	OBSERVACIONES (cm ⁻¹)
350-01	EHA	Del análisis FT-IR se observa que el espectro de la muestra presenta los siguientes picos a: 3356.76, 1611.82, 1520.17, 1444.95, 1368.78, 1281.72, 1108.51, 774.02.
350-02	EHB	Del análisis FT-IR se observa que el espectro de la muestra presenta los siguientes picos a: 3350.67, 1613.43, 1520.43, 1446.35, 1281.70, 1112.58, 775.34.

Muestra proporcionada por el cliente.

Método: USAQ-ME-10. Determinación de compuestos por FT-IR.



Quím. María Angélica Rodríguez Best
Directora de la USAQ
CQP:597

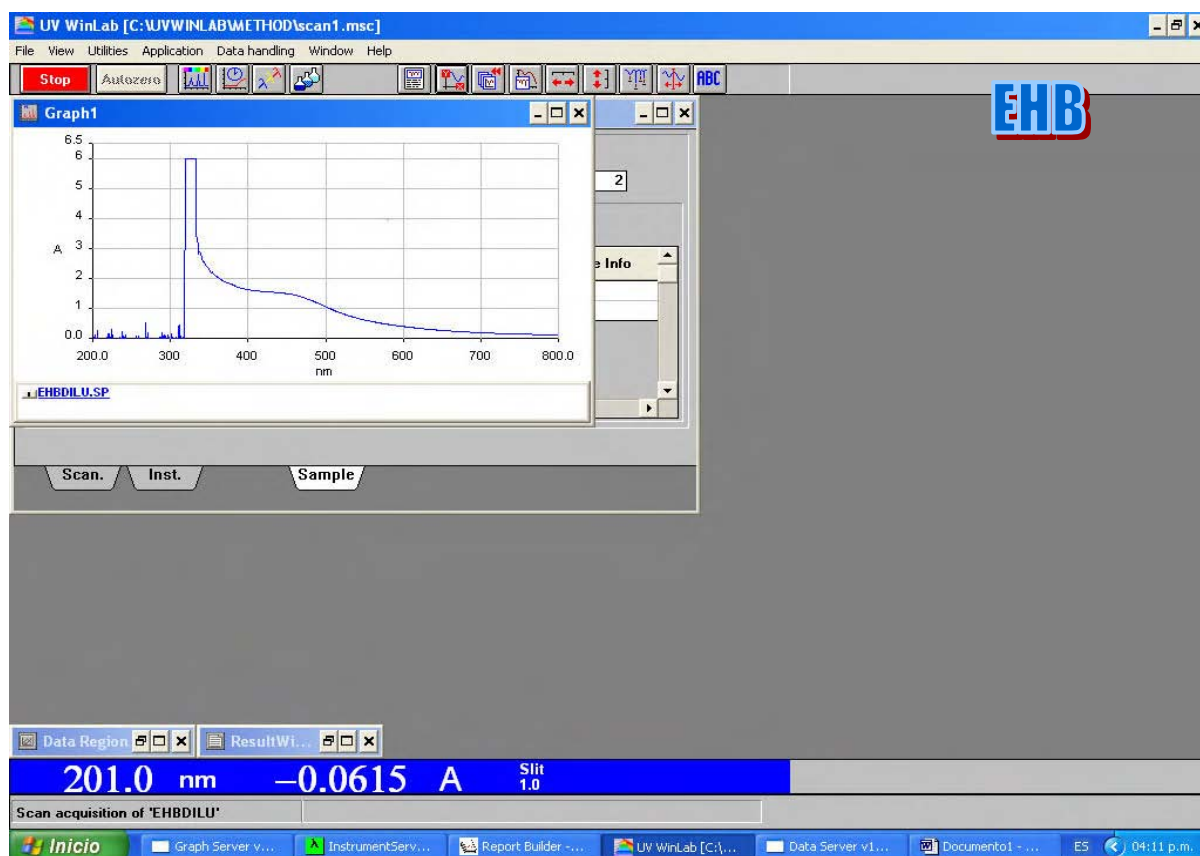
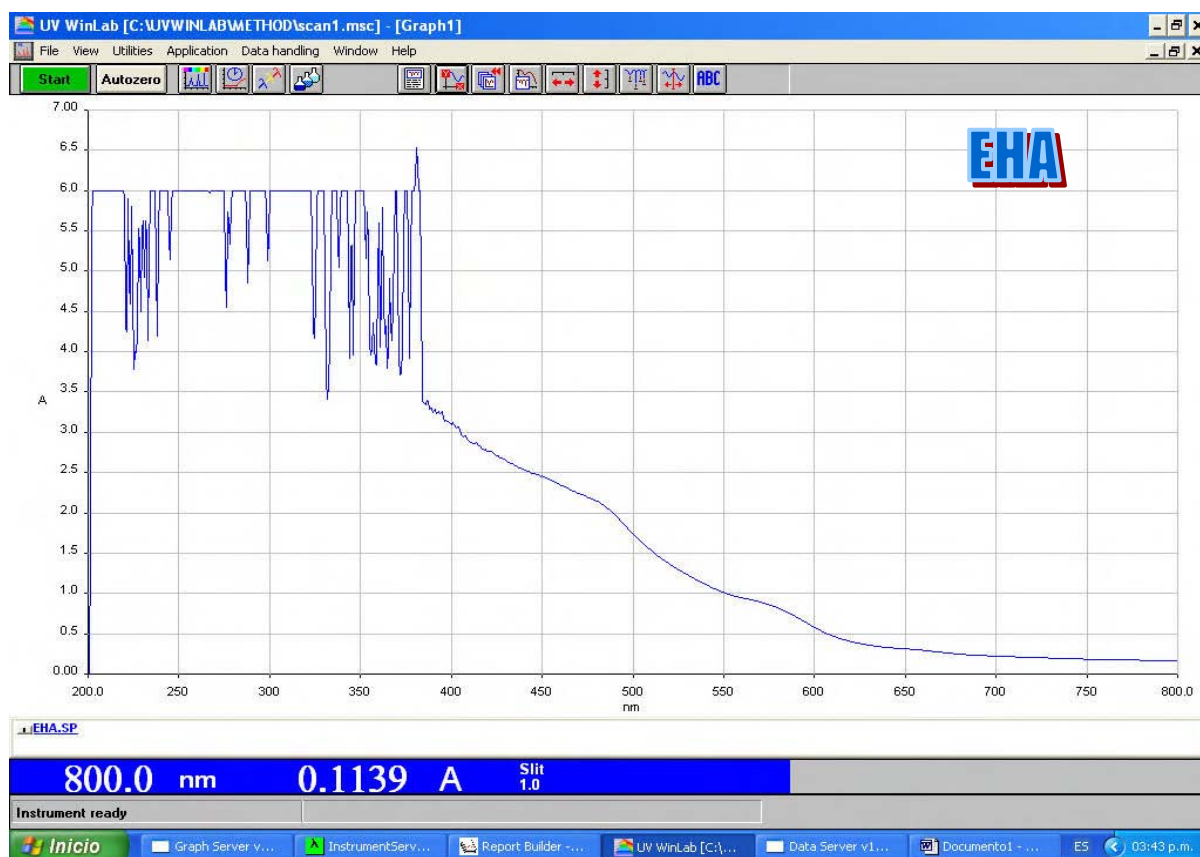
Nota:
El presente Informe solamente es válido en su estado original y se refiere únicamente a la muestra analizada cualquier corrección, o enmienda en el mismo lo anula automáticamente.

Observ.:
La muestra podrá ser devuelta dentro del plazo de 15 días calendarios de recepción. Sin embargo, cualquier consulta de resultados podrá ser absuelta dentro de los 15 días calendarios de emitido el Informe de Ensayo, dado el tiempo indicado no se aceptaran reclamos.

IE-511-08(Página 1 de 1)

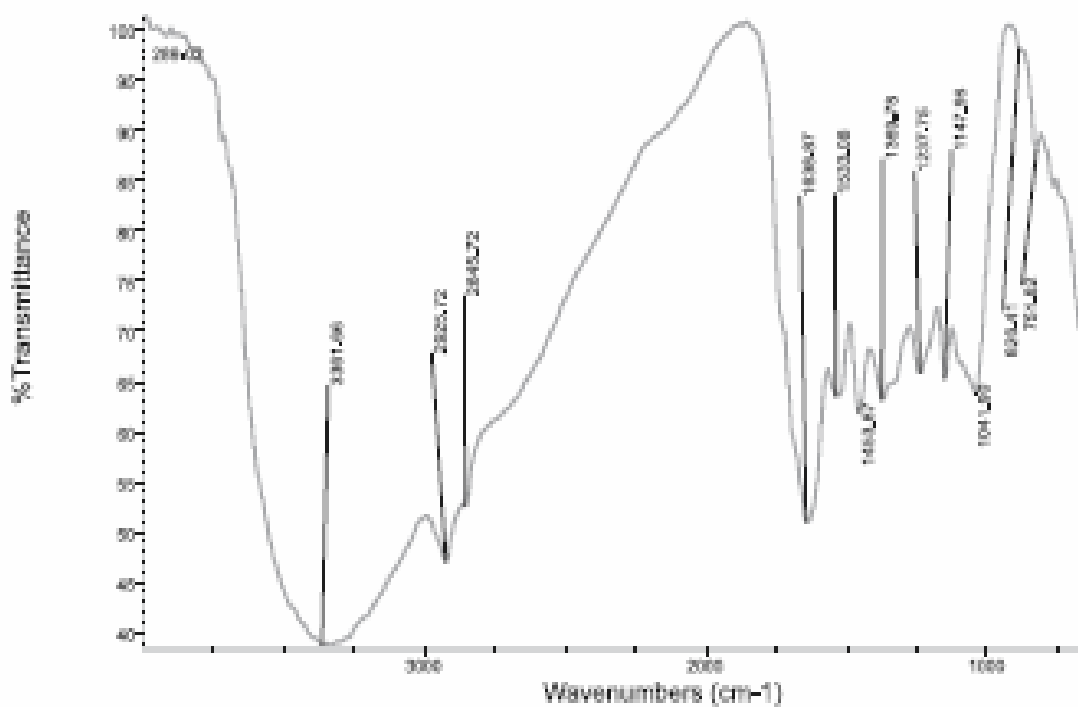
Av. Venezuela cdra. 34 - Ciudad Universitaria - Pabellón B Química, Central Telefónica: 619-7000 anexo 1203, Fax 1218
E-mail: usaq@unmsm.edu.pe

ANEXO Nº 4: Captura de pantalla del espectro UV/visible del extracto hidroalcohólico desecado (EHA) y el aislado amílico del hidrolizado del extracto hidroalcohólico desecado (EHB)

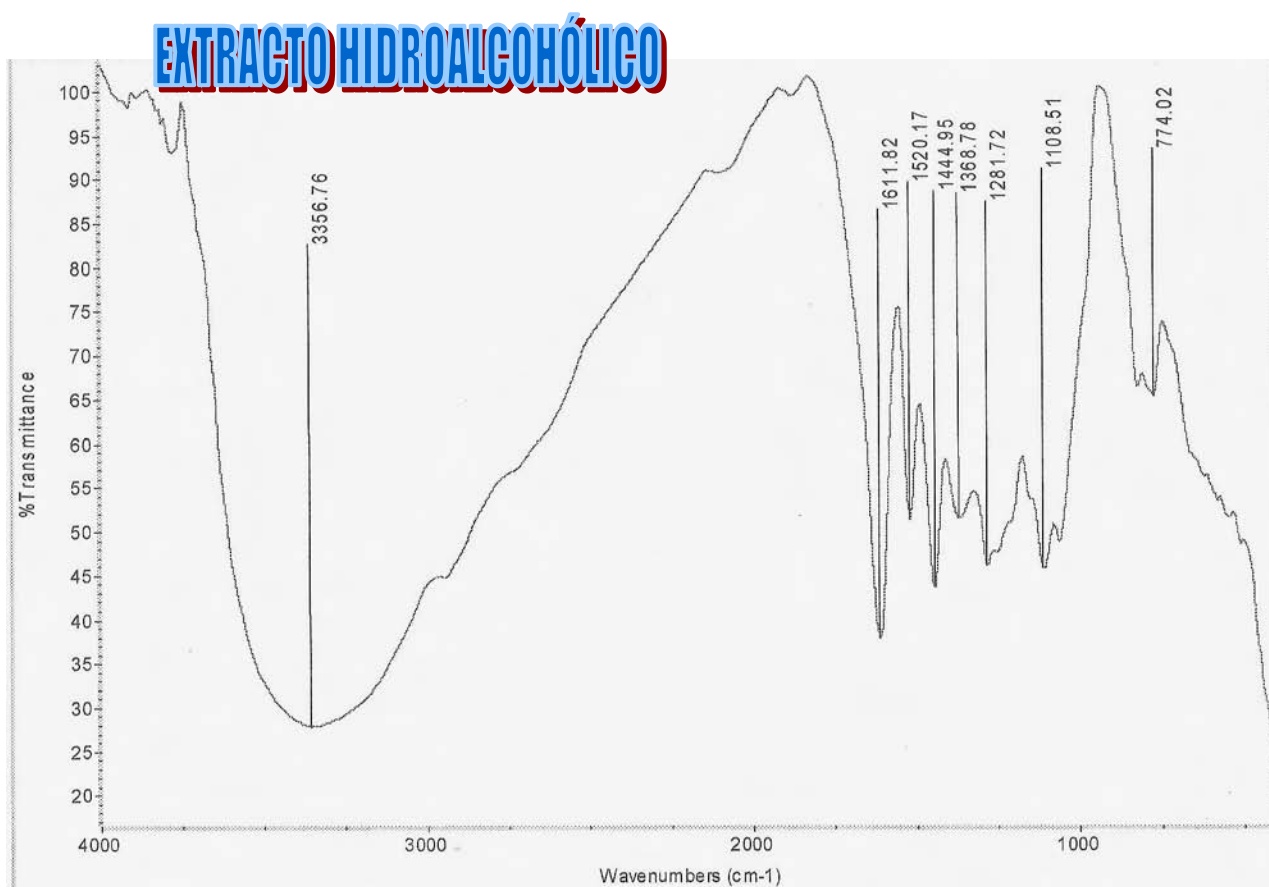


ANEXO Nº 5: Comparación del espectro Infrarrojo de las muestras de infusión de *Camellia sinensis* (Té verde) y el espectro del extracto hidroalcohólico desecado.

Té verde Infrarrojo con transformada de Fourier de la muestra de Organic Nature's Cuppa Ceylon



En la Fig 3 se registra la espectroscopía de muestra de Organic Nature's Cuppa Ceylon.



ANEXO Nº 6 A: Fotos del ensayo de la cuantificación de taninos del extracto hidroalcohólico desecado y cuantificación de taninos condensados.

ENSAYO A: Fenoles totales



ENSAYO B: Fenoles residuales



ANEXO Nº 6 B: Fotos del ensayo de la cuantificación de taninos del extracto hidroalcohólico desecado y cuantificación de taninos condensados.

PRECISIÓN: ANALISTA 1



PRECISIÓN: ANALISTA 2



CUANTIFICACION TANINOS CONDENSADOS: TRATAMIENTO

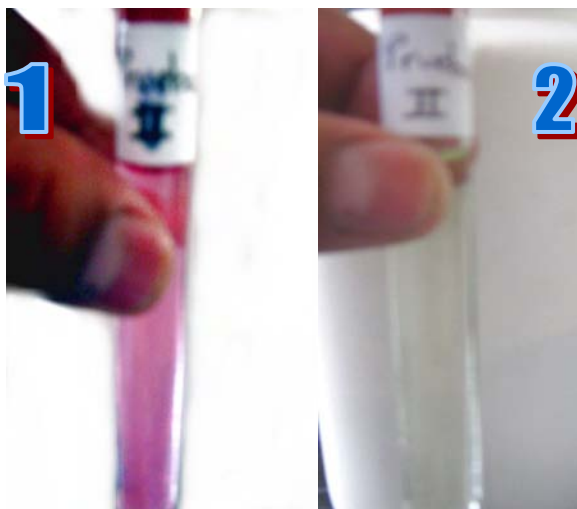


ANEXO Nº 7: Fotos del ensayo de la toxicidad aguda a dosis límite del extracto

hidroalcohólico desecado disuelto en agua desionizada pasteurizada.



ANEXO Nº 8 A: Fotos de la investigación antioxidante del extracto hidroalcohólico desecado.



LEYENDA:

1. Reacción del extracto hidroalcohólico desecado disuelto en agua desionizada, con el radical DPPH. Antes de reposo.
2. Reacción del extracto hidroalcohólico desecado disuelto en agua desionizada, con el radical DPPH. Después de reposo.

Reacción del trolox con el radical DPPH.



ANEXO Nº 8 B: Fotos de la investigación antioxidante del extracto hidroalcohólico desecado.

Reacción del extracto hidroalcohólico con el radical DPPH.



ANEXO Nº 9 A: Fotos de la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico desecado.

Distribución de placas de Petri para actividad antimicrobiana



Preparación de muestra



ANEXO N° 9 B: Fotos de la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico desecado.

Extracto hidroalcohólico diluido



Crecimiento de cepas bacterianas



Evaluación inicial del extracto frente a *Staphylococcus aureus*

